

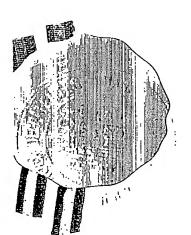


REC'D 0 2 MAR 2004

CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE ADICIONAL número 200302671, que tiene fecha de presentación en este Organismo el 17 de Noviembre de 2003.

Madrid, 16 de Febrero de 2004



El Director del Departamento de Patentes e Información Tecnológica.

CARMEN LENCE REIJA

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



INSTANCIA DE SOLICITUD

Officing Esp			NÚMERO DE SOL	©0°0 3 0 2	671	
1) MODALIDAD			FECHA Y HORA D	F PRESENTACIÓN E	NLAO.E.P.M.	
	DELO DE UTILIDAD	,	LOGICATION	E PRESENTACIÓN E	7 11:20	
A	NCIPAL O DE ORIG					
AAODALIDAI	Patente Inv	ención	EECHA V HODA B	RESENTACIÓN EN LI	UGAR DISTINTO O.E.	P.M.
ADICIÓN A LA PATENTE N.º SOLICIT	UD P20030020	06	FEORA I NORAL	ALOLIN AND AND AND AND AND AND AND AND AND AN		
SOLICITUD PROVISIONAL FECHA SOL		.2003				
☐ CAMBIO DE MODALIDAD			(4) LUGAR DE	PRESENTACIÓN:	CÓDI	GO
☐ TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE E	UROPEA		MAD	RID	12	181
☐ PCT: ENTRADA FASE NACIONAL						
5) SOLICITANTES: APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOC	NO!	MBRE	NACIONALIDAD ESPAÑOLA	CÓDIGO PAÍS ES	DNI/CIF CNAE	PYME
EFARMES, S.A.			ESPANOLA	ES		
•		!	·			
6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE:			<u> </u>			
			TELÉFONO	· L		
DOMICILIO SARDENYA, 350			FAX	L		
LOCALIDAD Barcelona				OSTAL 108025	: 1 .	
PROVINCIA			CÓDIGO P CÓDIGO P		· ·	
PAÍS RESIDENCIA ESPAÑA NACIONALIDAD ESPAÑOLA			CÓDIGO P			
7) INVENTORES: APELLIDOS		N	OMBRE		IONALIDAD	CÓDIGO
1- MATA LÓPEZ		PEDRO	PEDTO		AÑOLA AÑOLA	ES
2- ALONSO KARLEZI 3- MOZAS ALONSO		RODRIGO AI PILAR	LBERTO		AÑOLA	ES
4- REYES LEAL		GILBERTO		ESP	AÑOLA	ES
8); EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR		(9) MODO DE	OBTENCIÓN DE	L DERECHO:		
EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O EL	ÚNICO INVENTOR	INVENC. LA	BORAL	CONTRATO	SUCESIÓN	
10) TITULO DE LA INVENCIÓN:						
"PROCEDIMIENTO Y DISPOSITIVO DE DETE					ECEPTOR DE	,
LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD (LDL-F	R) ASOCIADO CON I	LA HIPERCOLES	STEROLEMIA FAI	MILIAR"		
(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOL	ÓGICA:] sı 🔀 no		
(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR			•	FECHA		
(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:	CÓDIGO PAÍS	NÚM	IERO		FECHA	
PAÍS DE ORIGEN						
(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIE	NTO DE PAGO DE	TASAS PREVIST	O EN EL ART. 16	52. LEY 11/1986 DE	PATENTES [3
(15) AGENTE/REPRESENTANTE:NOMBRE Y DIRECTION IGNACIO DIEZ DE RIVERA ELZABURI Miguel Ángel 21 28010 - Madrid	IÓN POSTAL COMPLETA.	(SI AGENTE P.L, NON	BRE Y CÓDIGO)(RELL			
			· ·	IRMA DEL SOLICITAN	TE O REPRESENTAL	NTE
(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACC				ENACIO/DIEZ DE	/ /	
DESCRIPCIÓN N.º DE PÁGINAS: 45 N.º DE REIVINDICACIONES: 16	X DOCUMENTO DE		**	or mi ompenero		••••
DIBUJOS, N.º DE PÁGINAS:	HOJA DE INFORM					
☐ LISTA DE SECUENCIAS N.º DE PÁGINAS: 106 ☐ RESUMEN	PRUEBAS DE LOS	S DIBUJOS DE PROSPECCIÓN			NICACIÓN AL DORSO)	
DOCUMENTO DE PRIORIDAD	OTROS: DISQU	JETE Y DOCUME	ENTO CESION	FIRMA DEL FUNCION	AKIU	
☐ TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD				/		
NOTIFICACIÓN SOBRE LA TASA DE CONCESIÓN:	materials of the members of	l nago de la tron de	ennosión:		`	
Se le notifica que esta solicitud se considerará para el pago de esta tasa dispone de tres meses a conte BOPI, más los dios dise que estableca el art 81 del R.D.	reurada si no procede a or desde la publicación de 2245/1986.	el anuncio de la con	cesión en el	L		





HOJA DE INFORMACION COMPLEMENTARIA

NÚMERO DE SOLICITUD 2 6 7 1

FECHA DE PRESENTACIÓN

17 NOV. 2003

(3) SOLICITANTES: APELLIDOS NOMBRE NACIONALIDAD CODIGO PAÍS DINICIF CNAE PYMI (7) INVENTORES: APELLIDOS NOMBRE NACIONALIDAD 5) POCOVÍ MIERAS MIGUEL ESPAÑOLA 6) CASTILLO FERNÁNDEZ SERGIO ESPAÑOLA 7) TEJEDOR HERNÁNDEZ DIEGO ESPAÑOLA 5 8) MARTÍNEZ MARTÍNEZ ANTONIO ESPAÑOLA 9) MALLEN PÉREZ MIGUEL ESPAÑOLA ESPAÑOLA 6 CASTILLO FERNÁNDEZ NATONIO ESPAÑOLA 5 B) MARTÍNEZ MARTÍNEZ MIGUEL ESPAÑOLA 6 CEPAÑOLA 6 ESPAÑOLA 7 B) MALLEN PÉREZ FERMÁNDEZ FERMÁNDEZ FERMÁNDEZ ANTONIO ESPAÑOLA 6 ESPAÑOLA 6 ESPAÑOLA 6 ESPAÑOLA 7 B) MALLEN PÉREZ FERMÁNDEZ FECHA 6 ESPAÑOLA FECHA 7 B) MALLEN PÉREZ FECHA 6 ESPAÑOLA FECHA 7 B) MALLEN PÉREZ FECHA PÉR	A PATENTE DE INVENCIÓN	_ □ мо	ODELO DE UTIL	IDAD		
5) POCOVÍ MIERAS MIGUEL ESPAÑOLA 6) CASTILLO FERNÁNDEZ SERGIO ESPAÑOLA 7) TEJEDOR HERNÁNDEZ DIEGO ESPAÑOLA 8) MARTÍNEZ MARTÍNEZ ANTONIO ESPAÑOLA 9) MALLEN PÉREZ MIGUEL ESPAÑOLA (12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR FECHA (13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD: CÓDIGO PAÍS NÚMERO FECHA	(5) SOLICITANTES: APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL	NOMBRE	NACIONALIDAD	CÓDIGO PAÍS DNI	/CIF CNA	B PYME
(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD: CÓDIGO PAÍS NÚMERO FECHA	5) POCOVÍ M 6) CASTILLO 7) TEJEDOR H 8) MARTÍNEZ	IERAS FERNÁNDEZ IERNÁNDEZ MARTÍNEZ	MIGUEI SERGIO DIEGO ANTONI		ESPAÑ ESPAÑ ESPAÑ ESPAÑ	OLA OLA OLA OLA
PAIS DE ORIGEN	CÓE	DIGO	· ÚMERO			





NÚMERO DE SOLICITUD

P200302671

FECHA DE PRESENTACIÓN

. . . 17 NOV. 20C3

RESUMEN Y GRÁFICO

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

Procedimiento y dispositivo de detección de mutaciones secuencias genicas aisladas del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL-R) asociado con la hipercolesterolemia familiar. La invención describe métodos extracorpóreos para analizar la presencia o ausencia de veintinueve mutaciones causantes hipercolesterolemia familiar. Los métodos indican la forma de detectar estas mutaciones a partir de una muestra de ADN de un individuo y utilizando la reacción en cadena de la polimerasa con receptor complementarios del ai gen cebadores producto análisis del baja densidad, el de lipoproteínas amplificado por secuenciación, análisis de restricción, técnicas de los polimorfismos de conformación de cadena sencilla, análisis de heterodúplex y de un dispositivo sobre un soporte de vidrio "biochip" en el que se depositan sondas de oligonucleótidos que permite detectar estas veintinueve mutaciones en el ADN.

GRÁFICO





12	SOLICITUD DE ADICIÓN A LA P	ATENTE	2	200302671
31 NÚMERO	DATOS DE PRIORIDAD (32) FECHA	3 PAÍS		(17 NOV. 2003
				(f) PATENTE PRINCIPAL 200300206
3 SOLICITANT EFARMES DOMICILIO	S, S.A. SARDENYA, 350, 08025 Barce-	- NACIONALIDAD	esp	pañola
12 INVENTOR GILBERTO	lona, España (ES) PEDRO MATA LÓPEZ, RODRIGO ALB REYES LEAL, MIGUEL POCOVÍ MIERAS,	ERTO ALONSO KA SERGIO CASTII	ARLEZI, LO FERN	PILAR MOZAS ALONSO, NÁNDEZ, DIEGO (X)
⑤1 Int. Cl.		GRÁFI	CO (SÓLO PA	ARA INTERPRETAR RESUMEN)
				•••••
				 .
64 TÍTULO DE	LA INVENCIÓN			•••••
DE MUTA	MIENTO Y DISPOSITIVO DE DETEC CIONES EN SECUENCIAS GENICAS RECEPTOR DE LIPOPROTEINAS DI	AISL <u>A</u>		•••••
DENSIDA	D (LDL-R) ASOCIADO CON LA HII LEMIA FAMILIAR			
(57) RESUMEN				••••

Procedimiento y dispositivo de detección de mutaciones secuencias genicas aisladas del receptor de lipoproteínas de baja. densidad (LDL-R) asociado con la hipercolesterolemia familiar. La invención describe métodos extracorpóreos para analizar la: presencia o ausencia de veintinueve mutaciones causantes hipercolesterolemia familiar. Los métodos indican la forma de detectar estas mutaciones a partir de una muestra de ADN de individuo y utilizando la reacción en cadena de la polimerasa con complementarios a l gen del receptor lipoproteínas de baja densidad, el análisis del amplificado por secuenciación, análisis de restricción, técnicas de los polimorfismos de conformación de cadena sencilla, análisis de heterodúplex y de un dispositivo sobre un soporte de vidrio "blochip" en el que se depositan sondas de oligonucleótidos que permite detectar estas veintinueve mutaciones en el ADN.

(X) TEJEDOR HERNÁNDEZ, ANTONIO MARTÍNEZ MARTÍNEZ Y MIGUEL MALLEN PÉREZ

DA PÁGINA NE I A MEMORIA

Mar. 2407

CERTIFICADO DE ADICION A LA PATENTE 200300206 PARA UN: PROCEDIMIENTO Y DISPOSITIVO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES EN SECUENCIAS GÉNICAS AISLADAS DEL RECEPTOR DE LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD (LDL-R) ASOCIADO CON LA HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR.

Ambito de la invención

5

10

15

20

25

30

La invención se adscribe al sector técnico-industrial del diagnóstico in vitro, extracorpóreo, de muestras biológicas, mediante técnicas de ingeniería genética, para determinar la predisposición de un individuo al desarrollo de la enfermedad denominada hipercolesterolemia familiar.

Antecedentes de la invención

La aterosclerosis se define según la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una combinación de cambios que se produce en la íntima de las arterias a consecuencia de un acúmulo focal de lípidos y componentes complejos que se acompaña con la formación de tejido fibroso y calcificación que a su vez se asocia con cambios en estructura de la media.

La aterosclerosis puede considerarse como una forma especial de arteriosclerosis con un depósito patogénico de lípidos en la pared arterial. La mayoría de formas de la arteriosclerosis implican la degeneración grasa de la pared vascular, con lo que el término arteriosclerosis y aterosclerosis suele utilizarse de forma indistinta (Assmann G. in "Lipid Metabolism and Atherosclerosis" Schattauer Verlag GMbH, Stuttgart 1982:1).

Los lípidos son sustancias insolubles en disoluciones acuosas. Las lipoproteínas son las partículas que posibilitan el transporte de los lípidos en la sangre. Las lipoproteínas se dividen en varias categorías según su densidad dependiendo de como pueden separarse por ultracentrifugación. (Havel RJ y col. J Clin Invest 1955, 34:1345). Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (d=1.019-1.063 g/mL) son las que mayoritariamente transportan el colesterol en el torrente circulatorio. Estas lipoproteínas están formadas por el 75% de lípidos (principalmente colesterol libre, colesterol esterificado y fosfolípidos), alrededor el 70 % del colesterol total de la sangre es transportado por las partículas LDL.

El término hipercolesterolemia se utiliza para reflejar la elevación del colesterol del plasma por encima de los niveles considerados normales para una determinada población y es uno de los factores cruciales para el inicio y progresión de la arteriosclerosis. Más de la mitad de todas las muertes que se producen en los países desarrollados están relacionados con la enfermedad cardiovascular arteriosclerosa (Murray CJL y Lopez AD. Lancet 1997; 349:1269-1276).

5

10

15

20

25

30

Las hipercolesterolemia familiar (HF) es una enfermedad de herencia autosómica dominante causada por mutaciones que se producen en el gen del receptor de las LDL (r-LDL), este gen codifica una proteína que permite la captación y degradación intracelular de las LDL (Goldstein JL, y Brown MS Ann Rev Cell Biol 1985; 1:1-39).

La penetrancia de la HF es cercana al 100% lo que significa que la mitad de la descendencia de una persona afectada tendrá su colesterol plasmático muy elevado desde el momento de nacer, afectando por igual a hombres y mujeres (Goldstein JL, Brown MS.

The metabolic basis of inherited disease. Editores: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Walle D. McGraw Hill New York 6th edition, 1989; 1215-1250).

Los pacientes con HF presentan como síntomas característicos clínicos arco corneal, xantomas tendinosos y enfermedad coronaria prematura (Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group. Atherosclerosis 1999; 142: 105-115). La HF es una de las enfermedades monogénicas mas frecuentes con una prevalencia estimada de pacientes heterocigotos de una en cada 500 personas y de heterocigotos de una en cada 1.000.000.

Determinadas poblaciones tales como los canadienses de habla francesa (Leitersdorf E y col. J Clin Invest 1990; 85:1014-1023), cristianos libaneses (Lehrman MA y col. J Biol Chem 1987; 262:401-410), drusos (Landsberger D y col. Am J Hum Genet 1992; 50: 427-433) finlandeses (Koivisto UM y col. J Clin Invest 1992; 90:219-228), los "afrikaners" de Surafrica (Kotze MJ y col. Ann Hum Genet 1991; 55:115-121), los judíos Ashkenazi de descendencia lituana (Meiner V y col. Am J Hum Genet 1991; 49:443-449) presentan la particularidad que solo tienen unas pocas mutaciones responsables de la HF, esto es consecuencia de un efecto fundador y por lo tanto la frecuencia de heterocigotos en estas poblaciones es mas alta que lo estimado para otras poblaciones.

Los pacientes con HF presentan una concentración de colesterol en plasma muy elevada, por regla general superior al percentil 95. La mortalidad de los pacientes con HF, ajustada por edad y sexo, es entre cuatro y cinco veces mas alta que en la población general (Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group. Atherosclerosis 1999; 142: 105-115). Los pacientes que heredan dos mutaciones en el locus del gen del r-LDL se denominan HF homocigotos o HF heterocigotos compuestos en cuyo caso prácticamente no hay receptores funcionales lo que condiciona que la concentración de c-LDL se eleve entre seis y ocho veces en relación a la considerada normal. La mayoría de pacientes de esta categoría presentan enfermedad coronaria antes de los 20 años (Goldstein JL y col. N Engl J Med 1983; 309:288-296). Si los pacientes homocigotos o los heterocigotos fueran diagnosticados antes de que presentaran signos de enfermedad coronaria y tratados de forma preventiva su riesgo de infarto de miocardio se vería reducido de forma sustancial

5

10

15

20

25

30

El r-LDL es una glicoproteína ubicua de membrana de 839 aminoácidos que capta :....
e internaliza partículas LDL por un mecanismo denominado de endocitosis (Goldstein J. :....
y Brown M. J Biol Chem 1974; 249:5153-5162).
El gen del r-LDL se encuentra situado en el brazo corto del cromosoma 19 región p13.1-

13.3 (Yamamoto T y col. Cell 1984;39: 27-38), tiene un tamaño de 45.000 pares de bases (pb). Este gen consta de 18 exones y 17 intrones los cuales codifican los seis dominios funcionales de la proteína: El péptido señal, el dominio de unión del ligando, el dominio homólogo al factor de crecimiento epidérmico (EGF), la zona de glicosilación, el dominio transmembrana y el citoplásmico (Sundhof T y col. Science 1985; 228:893-895).

La síntesis de r-LDL se encuentra regulada por un sofisticado mecanismo de retroalimentación que controla la transcripción del gen del r-LDL en función de las variaciones de la concentración intracelular de esteroles y la demanda celular de colesterol (Sudhof TC y col. J Biol Chem 1987; 262:10773-10779). Las secuencias del ADN necesarias para la regulación de la transcripción del gen del r-LDL están situadas en una región de 177 pb de la zona promotora (Sudhof TC y col. J Biol Chem 1987; 262: 10773-10779). Esta región contiene todos los elementos en cis que permiten la expresión basal así como la regulación por esteroles y contiene tres repeticiones de 16 pb cada una. La repetición 1 y 3 contienen un sitio de unión para el factor de transcripción Sp1 y son esenciales para que se produzca la expresión basal del gen pero requieren de la

Chem 1988; 263;3372-3379). La repetición 2 incluye un elemento de regulación por esteroles de 10 pb, SRE-1 (Smith JR y col. J Biol Chem 1990; 265:2306-2310) que posibilita la unión del factor de transcripción denominado SREBP-1 el cual aumenta la transcripción cuando la concentración de esteroles intracelulares disminuye. Hasta la fecha, se han descrito varias mutaciones situadas en los elementos reguladores de la transcripción del receptor LDL (Hobbs HH, y col al. Hum Mutat 1992; 1:445-466; Koivisto UM. Y col Proc Natl Acad Sci USA, 1994; 91:10526-10530), Mozas P, y col J Lipid Res 2002; 43:13-18, http://www.ucl.ac.uk/fh; http://www.umd.necker.fr).

5

10

15

20

25

30

El exón 1 codifica el péptido señal el cual consiste en una secuencia de 21 amino ácidos que es eliminado de la proteína durante la translocación que tiene lugar en el redículo endoplásmico. Se han descrito varias mutaciones en este exón que incluyen cambios de pauta de lectura, cambios de aminoácido o codones de parada (http.//www.ucl.ac.uk/fh; http.//www.umd.necker.fr).

Los exones del 2 al 6 codifican el dominio de unión al ligando, el cual consta de siete repeticiones en tandem de 40 amino ácidos. La estructura de este dominio ha sido resuelta de forma parcial (Jeon H y col. Nature Struc Biol 2001; 8:499-5049). En cada repetición tiene una agrupación de aminoácidos cargados negativamente Asp-X-Ser-Asp-Glu y seis restos de cisteina que forman tres enlaces disulfuro.

El segundo dominio del r-LDL consta de una secuencia de 400 amino ácidos codificada por los exones 7 al 14. Esta secuencia tiene un 33% de homología con el factor precursor del crecimiento de la epidermis (EGFP). Al igual que el dominio de unión al ligando, esta región, contiene tres repeticiones de 40 amino ácidos con secuencias ricas en cisteina. Las dos primeras repeticiones, denominadas A y B, son contiguas y están separadas de la tercera repetición por una región de 280 amino ácidos que contiene cinco copias de la secuencia YWTD (Tyr-Trp-Thr-Asp). El dominio análogo al EGFP es fundamental para la disociación ácida del r-LDL de las partículas recubiertas de clatrina que tiene lugar en el endosoma durante el proceso de reciclado del receptor. De todas las mutaciones descritas hasta la fecha, aproximadamente el 55% están localizadas en la región homóloga EGFP y el 35% están localizadas en las repeticiones YWTD (http://www.ucl.ac.uk/fh).

El tercer dominio del r-LDL, codificado por el exón 15, es una región en la que abundan los amino ácidos treonina y serina. La función de este dominio se desconoce, pero se sabe que en esta región están anclados las cadenas de carbohidratos. Esta zona está muy poco conservada en seis especies analizadas y se cree que desempeña una función estabilizadora del receptor. (Goldstein y col. En The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. Editores Sciver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. 7th Edition. McGraw Hill, 1995: 1981-2030).

5

10

15

20

25

30

El dominio transmembrana consta de 22 amino ácidos hidrofóbicos codificados por el exón 16 y el extremo 5' del exón 17. Este dominio es esencial para el anclaje del receptor a la membrana celular.

El dominio citoplásmico del r-LDL, está formado por una secuencia de 50 amino ácidos codificada por la región 3' del exón 17 y la 5' del exón 18. Este dominio contiene dos secuencias señal que permiten dirigir a la proteína a la superficie celular y situar al receptor en las partículas revestidas (Yokode M, y col. J Cell Biol 1992;117: 39-46). Este dominio es uno de los más conservados, con un porcentaje de aminoácidos conservados del 86% entre seis especies analizadas.

Las mutaciones del r-LDL que se han encontrado en pacientes con HF se clasifican en 5 clases: alelos nulos, defectuosos en el transporte, defectuosos en la unión, en la internalización y reciclado. Por regla general cada categoría está asociada con mutaciones localizadas en una región del gen que codifican un dominio particular de la proteína. (Hobbs HH, et al. Hum Mutat 1992; 1:445-466).

La heterogeneidad que presentan los pacientes con HF en cuanto a los niveles plasmáticos de colesterol ligado a LDL (C-LDL) y enfermedad coronaria se debe en parte a diferencias en cuanto al tipo de mutación (Sun XM y col. Arterioscler Thromb Vas Biol 1993; 13:1680-1688, Kotze y col. Arterioscler Thromb Vas Biol 1993; 13:1460-1468; Gudnason V y col. Arterioscler Thromb Vas Biol 1997;17:3092-3101). Por otra parte, el descenso que se produce en la concentración del c-LDL en pacientes HF heterocigotos tras el tratamiento con inhibidores de la hidroxi-metilglutaril coenzima A (HMGCoA) reductasa depende, en parte, de la naturaleza de la mutación del gen r-LDL (Leisterdorf E y col. Circulation 1993; 87:35-44; Jeenah M y col. Atherosclerosis 1993; 98:51-58, Sijbrands EJG y col. Atherosclerosis 1998;136: 247-254).

5

10

15

20

25

30

El principal ligando del receptor es la partícula LDL la cual contine una sola copia de una proteína denominada la apolipoproteína B-100 (ApoB-100) (Goldstein J y Brown M J Biol Chem 1974;249:5153-5162). Esta apolipoproteína tiene una zona en la que abundan los aminoácidos básicos y es el lugar donde se une al receptor (Borén J y col. J Clin Inves 1998; 101: 1084-1093). Se han encontrado varias mutaciones en el gen de la apoB-100 que alteran la funcionalidad de la proteína y disminuyen la capacidad de retirada de las partículas LDL, dando como resultado el acúmulo de c-LDL en plasma Hasta la fecha se han descrito cuatro mutaciones en el gen de apo B-100 que cursan con una hipercolesterolemia que se denomina apolipoproteína B defectuosa familiar (BDF), todas estas mutaciones se encuentran localizadas en el dominio de unión de la apo-B100; amino ácidos 3130-3630: R3480W, R3500Q, R3500W y R3531C (Soria L y col. Proc :.... Natl Acad Sci USA 1989; 86: 587-591; Pullinger CR, y col. J Clin Invest 1995; 95:1225-1234; Gaffney D, y col. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995; 15:1025-1029; Boren J, y col. J Biol Chem 2001; 276;9214-9218). Una mutación que cambia el codón de la posición 3500 CGG por CAG dando lugar a una sustitución de una Glutamina por Arginina (R3500Q), es la mas frecuente de toda las que cursan con BDF. Los pacientes heterocigotos para la mutación apo B-3500 son por regla general hipercolesterolemicos, aunque su concentración de colesterol total plasmático varía dentro del rango observado en pacientes con HF hasta concentraciones moderadamente elevadas. (Tybjaerg-Hansen A, y col. Atherosclerosis 1990; 80:235-242; Hansen PS, y col. Arterioscl Throm Vasc Biol 1997; 17:741-747). Dado que las características y bioquímicas de estos pacientes : son muy similares, el diagnóstico diferencial entre los pacientes con BDF o HF sólo es posible a través del diagnóstico genético molecular.

El diagnóstico clínico de la HF se fundamenta en los datos analíticos de lípidos y lipoproteínas del plasma, sintomatología clínica (xantomas) e historia familiar y personal de enfermedad coronaria. La OMS a través de su programa MedPed recomienda una serie de criterios a seguir para llevar a cabo el diagnóstico clínico de HF. Estos criterios basados en una puntuación que depende de la historia personal y familiar de hipercolesterolemia características clínicas y analítica del paciente. Cuando la puntuación que alcanza el paciente es igual o superior a 8 puntos el criterio clínico de diagnóstico de HF se clasifica como "seguro", entre 5 y 8 puntos de "probable" y entre 3 y 5 puntos de "posible" (Familial Hypercholesterolemia. Report of a second WHO consultation. The

International MedPed FH Organization, Geneva 1998). Sin embargo, algunos pacientes no cumplen con los criterios de HF porque la historia familiar es incompleta o desconocida, o bien porque en el momento del análisis solo presentan concentraciones moderadas de colesterol plasmático y carecen de signos de depósito de colesterol en tejidos, tales como xantomas tendinosos, arco corneal o xantelasmas.

5

10

15

20

25 .

30

En familias cuyo mutación del gen del r-LDL se conoce se ha demostrado que el mejor "punto de corte" para el diagnóstico es el utilizar el percentil 90 para la concentración de c-LDL (Umans-Eckenhausen MAW y col. Lancet 2001; 357:165-168. Sin embargo, el 18% de los pacientes portadores de la mutación presentan una concentración de colesterol total por debajo de este percentil, por otra parte, la proporción de falsos positivos fue también del 18%. Por lo tanto, se comete porcentaje alto de diagnósticos equivocados si se utiliza solo la cifra de colesterol plasmático. Se ha publicado, que más del 50% de los pacientes con HF no reciben tratamiento farmacológico hipolipemiante ni consejo dietético como consecuencia de no haber sido diagnosticados correctamente como pacientes con HF (Williams RR y col. Am J Cardiol 1993; 72:18D-24D).

El conocimiento de las bases moleculares de la HF ha permitido que se pueda realizar el diagnóstico inequívoco a nivel del ADN en la gran mayoría de casos: la demostración de un defecto molecular en el gen del r-LDL constituye una confirmación definitiva del diagnóstico (Familial Hypercholesterolemia. Report of a second WHO consultation. The International MedPed FH Organization, Geneva 1998). El diagnóstico preciso de la HF es posible utilizando métodos de biología molecular, sin embargo, en la actualidad su utilidad en poblaciones heretogéneas se encuentra limitada debido a la gran heterogeneidad de las mutaciones del gen del r-LDL.

En la solicitud PCT WO-88/03175 (Biotechnology Research Partners, Ltd.) se reivindica un método para el diagnóstico de la aterosclerosis, que se basa en la detección de la presencia o ausencia de varios polimorfismos en la región génica de la apolipoproteína AI-CIII-AIV, o en los genes apoB, apoCI, apoAII, así como en el gen del receptor de LDL. Concretamente para este gen, se presenta el empleo de los polimorfismos Cfr131 y BstEII.

Otro documento de interés es la patente japonesa JP-10099099 que, se refiere al empleo de una mutación en el triplete codificante del aminoácido 109, en concreto la

inserción de una C, para el diagnóstico de anormalidades en el gen del receptor de LDL, aunque no se menciona concretamente la hipercolesterolemia familiar.

Finalmente, las patentes norteamericana US-4.745.060 y US-4.966.837, ambas de la Universidad de Texas, presentan métodos para el diagnóstico de la hipercolesterolemia familiar basándose en mutaciones en el gen del receptor de LDL. Sin embargo, lo que se reivindica en la primera de ellas son secuencias correspondientes al gen "normal", presentando un ejemplo puntual de una mutación que se define por el cambio del mapa de restricción con Xba I. En la segunda patente, por su parte, se reivindica el empleo de varias enzimas de restricción (Eco RI, Asp 718, Taq I, Bam HI, Xba I, Inf. I, Bgl II, Cla I, Eco RV, Kpn I, Pvu II, Sph I, Sst I, Sst II, Stu I, Xho I, Nde I y Nsi I) en un método para determinar mutaciones en el gen r-LDL, que se basa en observar la alteración del modelo de restricción con estas enzimas frente al modelo correspondiente al gen normal.

El documento de patente más próximo a la invención es WO02/06467, en el que se describe un método de detección de errores en el metabolismo lipídico basado en una serie de mutaciones y polimorfismos del gen r-LDL. Sin embargo, ninguna de las mutaciones ni polimorfismos descritos en dicha patente coincide con los reivindicados en la presente solicitud.

Descripción detallada de la invención

5

10

15

20

La nomenclatura de las mutaciones y los polimorfismos viene definida en

- Antoranakis S. E and the Nomenclature Working Group, Recommendations for a Nomenclature Systems for Human Gene Mutations. Human Mutation 11:1-3; 1998.
- Dunnen JT, Antoranakis S.E. Mutation Nomenclature Extrensions and ...

 Suggestions to describe Complex Mutations: A Discusion. Human Mutation 15:7- ...

 12, 2000.

Asimismo el concepto del polimorfismos se define en

- Harris H. The Principles of Human Biochemical Genetics 3rd Edition.
 Amsterdam. North-Holland 1980.
- Beauder AL, Scriver CL, Sly WS, Valle D. Genetics, Biochemistry and Molecular
 Basis of Variant Human Phenotypes, En The Metabolic and Molecular Bases of

5

10

15

20

25

Inherited Disease. Editores Beaudet AL, Scriver CR, Sly WS, Valle D 7th Edition. pg. 53 MacGraw Hill. New York 1995.

Se han detectado, aislado y caracterizado toda una serie de mutaciones nuevas que se detallan a continuación. Asimismo, toda una serie de mutaciones y polimorfismos ya descritos, se han combinado con aquéllas para analizar la probabilidad de que un individuo desarrolle hipercolesterolemia familiar. Todas las mutaciones y polimorfismos que en esta invención se relacionan con el desarrollo de la hipercolesterolemia familiar, se producen en la secuencia génica SEQ ID NO:1 correspondiente al gen del receptor de lipoproteínas de baja densidad (r-LDL). Es decir, todas las mutaciones se producen en el mismo gen, se emplean en el mismo dispositivo de ensayo, utilizándose la misma tecnología, para determinar, según un mismo método, extracorpóreamente e in vitro, la probabilidad de desarrollar la misma enfermedad, lo que apoya el carácter unitario de la invención.

En la Tabla I se detallan todas las mutaciones nuevas detectadas, según la nomenclatura científicamente aprobada y detallada en las publicaciones mencionadas anteriormente. Asimismo se les otorga un código alfa-numérico. La Tabla IA contiene las mutaciones de la patente principal ES 200300206 y la Tabla IB contiene las mutaciones del presente certificado de adición a aquélla.

En la Tabla II se detallan mutaciones ya descritas y conocidas, cuyo uso en combinación con las mutaciones de la Tabla I, en dispositivos de ensayo in vitro para diagnóstico de la hipercolesterolemia familiar es una de las formas preferidas, nueva e inventiva, de realización de la invención. Asimismo, de forma análoga a lo mencionado para las mutaciones conocidas, en la Tabla III se detallan polimorfismos.

Las mutaciones de amino ácidos se representan en códigos de una letra que tienen ... su equivalencia según la Tabla IV.

TABLA IA

	Mutación	Código	•	
5	(-23)A>C	M002		
J	1054 del11	M006		
	108delC	M008		
	1197del9	M009		
	1207delT	M010		
10	1432delG	M012		
	191-2delAinsCT	M016		
	2184delG	M020		
	231delC	M022		
	2399del5/ins4	M024	•	
15	313+1insT	M027		, : .
	338del16	M029	••	
	510insC	M030	•	•
	675del15	M032		
	684dup12	M034		••••
20	941-39 C>T	M041	:	:
	C127R	M045	•	
	C195R	M046		
	C255G	M0100		•••
	C319Y	M050	·	••••
25	D157G	M059		••••
	D630N	M063 M068	·	••••
	E291X	M096	:	: .
	H635N	M074		
	N59K	M097		••••
30		M098		••••
	W515X Y379X	M092		::
		M093		••••
	Y421X	141033		••••
. 35	TA	BLA IB		:
	T433N	M105		
	818del8	M110		
	1423delGC/insA	M111	·	
4(M112		
-1.	451del3	M115		<i>:</i>
	G516X	M117	•	
	2389+4A>G	M120		•
	1815del11	M121		
4.		M129		
•	T740M	M131		
	I771T	M135		
	R279G	M138		

	T446I ·	M141
	H562Q	M142
	C74Y	M145
	D686Y	M147
5	G(-2)R	M149
3	E579D	M150
	S205C	M151
	D200V	M153
	V766E	M154
1.0	L(-6)P	M155
10	2544insC	M156
	C42Y	M157
	2389+3A>C	M160
	[1587-5del5;15	87del31]M161
. 15		

TABLA II

	Mutación	Código
20	2393del 9	M001
	(-42) C/G	M003
	(-49) C/T	M004.
	1045delC	M005
25	1043d67C	M007
23	A378T	M0102
	C358R	M0104
	1358 + 1 G/A	M011
	1706-10 G>A	M014
30	1845 + 1 G/C	M015
50	2085del19	M017
	211del G	M018
	2140 + 5 G/A	M019
	2207insT	M021
35	2390-1G/C	M023
55	313+1 G>C	M025
	313+1G/A	M026
	313+2GinsT	M028
	518 del G	M031
40	7delC	M035
40	872delC	M036
	884delT	M038
	920ins4	M039
	A519T	M042
45	C113W	M043
	C255X	M047
	C281Y	M048
	C297F	M049

	C347Y C371X	M051 M052
	C646Y	M053
	C677Y	M054
_	C68W	M055
5	C74G	M056
		M057
	C95R	M058
	D151N	
	D200G	M060
10	D200Y	M061
	D280G	M062
	E10X	M064
	E246A	M066
	E256K	M067
15 .	F634L	M069
	G322S	M070
	G352D	M071
	G571E	M072
	N543H	M073
20	N804K	M075
	Q12X	M076
	Q133X	M077
	Q357P	M078
	Q427X	M079
25	Q71 E	M080
	R395Q	M081
	R574W	M082
	R612C	M083
•	S156L	M084
30	S205P	M085
	T413K	M086
	T705I	M087
	V502M	M089
	W(-18)X	M090
35	W541X	M091
	D679E	M094
	1359 -1 G>A	M099
٠.	681ins21	M033
•	C122X	M044
40	V408M	M088
	G528D	M106
	D412H	M107
	N619N	M108
	E80K	. M109
45	L534P	M113
	L621S	M114
	C356Y	M116
	R329X	M119

	G248D	M122				
	C201Y	M125				
	313+5G>A	M126				
•	C358Y	M127				
5	C331R	M128				
Ÿ	D157N	M130				
	V776M	M134				•
	P664L	M136				
	W462X	M137				
10	Q328X	M139			•	
10	L584P	M140				
	R395W	M143				
	G314V	M144				
	W469X	M146				
15	P678L	M148				••••
10	R612H	M152			•	
	R236W	, M159				••••
						::
20		con A 10s1	LA III			•
	•	IAB	LAIII			• • • • •
	•	POLIMORFISM	os c	ÓDIGO		• •
		POLIMORISM		0222		• ••
. 25		81T>C BstUI Ex	rón 2.	P1		*****
		1060+10G>C Si	nal Exón 7	· P2		••••
		1171G>A Stul I	Exón 8	P3		· .
		1413G>A DdeI	Exón 10	P4		••••
		1617C>T BstNI	Exón 11	P5		•••
30		1725C>T SSCP	Exón 12	P6		• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •
		1771C>T HincI	I Exón 12	P7		
		1959 T>C AvaI	I Exón 13	P8		••••
		2232G>A MspI	Exón 15	P9		•••
25		22320 111			•	•
35	•					
		•				
		TAI	BLA IV			
	•	CÓDIGOS A	MINOÁCIT	oos		
40						
		Alanina	Ala	A		
•		Aspártico	Asp	D		
		Glutámico	Glu	E		
		Glicina	Gly	G		
45	5	Fenilalanina	Phe	F	-	
-	•	Leucina	Leu	L		
		Serina	Ser	S	8	

	Tirosina	Tyr	Y
	Cisteina	Cys	С
	Triptófano	Trp	W
	Leucina	Leu	L
-	Prolina	Pro	P
5	Histidina	His	H
. •	Glutamina	Gln	Q
	Arginina	Arg	R
	Isoleucina	Ile	I
	Metionina	Met	M
10	Treonina	Thr	T
	Asparagina	Asn	N
	Lisina	Lys	K
	Serina	Ser	S
_	Arginina	Arg	R
15	Valina	Val	V
	Vanna Terminación	Ter	X
			-

20

25

El dispositivo de ensayo (biochip) desarrollado en la invención consta de un soporte que presenta en su superficie toda una serie de sondas que se recogen en el listado de secuencias. Estas sondas oligonucleotídicas son capaces de hibridar con las secuencias mutadas contenidas en las Tablas I (IA y/o IB), II y III. La sistemática a utilizar sería la siguiente, para cada una de las mutaciones.

Impresión de los portas de vidrio

- Se imprimen los oligonucleótidos capaces de detectar la mutación en un porta de vidrio aminosilanado empleando DMSO como tampón de impresión.
- La impresión se lleva a cabo con un "spotter" o impresor de oligonucleótidos en el que se controlan la temperatura y la humedad.

Procesamiento de los portaobjetos de vidrio

Tras la impresión se somete a un tratamiento con radiación ultravioleta.

35

Preparación de la muestra a hibridar

Se extrae el ADN del paciente a partir de una muestra de sangre de aproximadamente
 300 μl mediante un protocolo de filtración.

- Se amplifican para dicho paciente todos los exones y el promotor del gen del receptor
 LDL, a través de PCR multiplex.
- En la misma reacción de amplificación se incorpora un nucleótido unido a biotina constituyendo un marcaje indirecto que requiere un revelado final con un complejo fluoróforo-estreptavidina.
- Se comprueba en gel de agarosa que ha tenido lugar reacción de amplificación.
- Se somete a fragmentación la muestra a hibridar.
- Se añade el tampón de hibridación.
- Se procede a la desnaturalización durante 15 minutos a 95 °C.

10

5

Hibridación

- La hibridación se lleva a cabo automáticamente en la estación desarrollada para tal fin por Amersham Biosciences.
- Se prehibrida el portaobjetos.
- Se inyecta con una pipeta Hamilton la solución a hibridar.
 - Se hibrida durante 1 hora.
 - Se lava 3 veces con tampón de lavado.
 - La estación procede al secado del soporte de vidrio.

20 Escaneado del portaobjetos

- Se introduce el portaobjetos en el escáner.
- Se procede a escanear la señal emitida por el marcaje estándar al ser excitado por el láser.

25 Cuantificación de la imagen

- El software del escáner nos permite cuantificar en la imagen obtenida la señal de los puntos donde se ha producido hibridación.
- A partir de la señal que se obtiene en los oligonucleótidos que detectan el alelo normal y el mutado establecemos la presencia o ausencia de la mutación en el paciente.

Cada mutación presenta en el portaobjetos cuatro oligonucleótidos repetidos 10 veces para su detección. Dos de ellos detectan el alelo normal y otros dos el mutado. La base interrogada se encuentra siempre en posición central.

En el caso de un individuo normal, no presenta alelo mutado. Por consiguiente en la imagen que se obtiene del soporte de vidrio los oligonucleótidos que detectan dicho alelo no presentan señal de hibridación o una señal menor que los oligonucleótidos que detectan el alelo normal.

5

10

15

20

25

30

Por el contrario, un individuo heterocigoto para la mutación presenta el alelo normal y el mutado. De ahí que los oligonucleótidos que detectan el alelo normal y el mutado presentan una señal de hibridación equivalente.

Los resultados de la hibridación del ADN-chip con PCRs marcados, producidos a partir del ADN de los individuos a analizar, demuestran que el individuo normal no tiene una mutación puntual en el gen rLDL que ocasiona un cambio de aminoácido E256K, y que el individuo es heterocigoto para esa mutación. De esta forma el individuo heterocigoto quedaría diagnosticado genéticamente como hipercolesterolémico familiar.

A continuación se detallan mediante ejemplos el análisis de algunas de las mutaciones detectadas con el dispositivo de ensayo de la invención.

EJEMPLO 1: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 1 del gen del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 215 pb del exón 1 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex1F (SEQ ID NO:2) y Ex1R (SEQ ID NO:3).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 μL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 μM de cada dNTP, 0,2 μM de cada desoxioligonucléotido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96° C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94° C durante 1 minuto, hibridación a 59° C durante 1 minuto y elongación a 74° C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72° C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP) y los fragmentos que mostraron un patrón

anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

5.

10

15

20

Análisis de la mutación L(-6)P

Esta mutación (47T>C, CTC>CCC, Leu(-6)Pro) se caracterizó mediante secuenciación automática del fragmento de 215 pb correspondiente al exón 1 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando los reactivos del kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex1F (SEQ ID NO:2) y Ex1R (SEQ ID NO:3). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio T>C observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Se llevó a cabo su confirmación posterior por secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 249 y SEQ ID NO: 250.

La mutación L(-6)P se encontró en una mujer de 47 años con arco corneal, cuyo padre tenía hipercolesterolemia con un CT de 350 mg/dL y dos tíos paternos con hipercolesterolemia habían fallecido de infarto de miocardio a los 24 y 33 años respectivamente. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 9 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 420 mg/dl, c-LDL 320 mg/dL, TG 155mg/dL y c-HDL 49 mg/dL. El tratamiento hipolipemiante con atorvastatina (15mg/día) redujo su concentración de CT y c-LDL a 289 y 233 mg/dL respectivamente.

25

Análisis de la mutación G(-2)R

5

10

15

20

25

30

Esta mutación (58G>A, GGG>AGG, Gly(-2)Arg) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 215 pb correspondiente al exón 1 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando los reactivos del kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex1F (SEQ ID NO:2) y Ex1R (SEQ ID NO:3). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio G>A observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 228, SEQ ID NO: 229 y SEQ ID NO: 230.

La mutación G(-2)R se encontró en una mujer de 34 años con arco corneal, cuya madre presentaba hipercolesterolemia con un CT de 400 mg/dL. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar en esta paciente alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 10 puntos. Sus concentraciones plasmáticas de lípidos antes del inicio del tratamiento farmacológico fueron: CT de 354 mg/dL, c-LDL de 264 mg/dL, con TG dentro de la normalidad y c-HDL de 64 mg/dL.

EJEMPLO 2: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 2 del gen del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 183 pb del exón 2 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex2F (SEQ ID NO: 4) y Ex2R (SEQ ID NO: 5).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 μL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 μM de cada dNTP, 0,2 μM de cada desoxioligonucléotido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96° C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94° C

durante 1 minuto, hibridación a 59° C durante 1 minuto y elongación a 72° C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72° C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP) y los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación C42Y

5.

10

15

20

25

30

Esta mutación C42Y (188G>A, TGC>TAG, Cys42Tyr) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 183 pb correspondiente al exón 2 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando los reactivos del kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex2F (SEQ ID NO:4) y Ex2R (SEQ ID NO:5) Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio G>A observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 257 y SEQ ID NO: 258.

La mutación C42Y se encontró en una varón de 17 años que presentaba arco corneal, y cuya madre tenía una hipercolesterolemia grave. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 10 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 350 mg/dL, con niveles de TG y c-HDL dentro de la normalidad. El tratamiento hipolipemiante con simvastatina (20 mg/día) disminuyó su concentración de CT y c-LDL a 274 y 214 mg/dL respectivamente.

Análisis de la mutación C74Y

5

10

15

20

25

30

Esta mutación C74Y (284 G>A, TGC>TAC, Cys74Tyr) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 196 pb correspondiente al exón 3 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando los reactivos del kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex3F (SEQ ID NO:6) y Ex3R (SEQ ID NO:7) Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio observado G>A se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 220, SEQ ID NO: 221 y SEQ ID NO: 222.

La mutación C74Y se encontró en un varón de 52 años que presentaba arco corneal y xantomas tendinosos con historia familiar de hipercolesterolemia en la infancia. Fue diagnosticado de hipercolesterolemia familiar con una puntuación según los criterios del MedPed de 17 puntos Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 420 mg/dL, TG 96 mg/dl y c-HDL 69 mg/dl. El tratamiento con un inhibidor de la HMG-CoA reductasa a dosis de 10 mg/día redujo su cifra de c-LDL en un 22%.

EJEMPLO 4: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 4A del gen del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 242 pb de la zona 5' del exón 4 (4A) por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos: Ex4AF (SEQ ID NO: 9) y Ex4AR (SEQ ID NO:10).

La reacción de amplificación se llevó acabo en un volumen final de 50 μL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 μM de cada dNTP, 0,2 μM de cada desoxioligonucléotido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96° C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94° C

durante 1 minuto, hibridación a 63° C durante 1 minuto y elongación a 72° C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip"):

Análisis de la mutación 451 del3

5

10

15

20

25

30

Esta mutación fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 242 pb correspondiente al exón 4 (4A) del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex4AF (SEQ ID NO:9) y Ex4AR (SEQ ID NO:10). La posterior electroforesis en secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. Esta deleción de tres nucleótidos se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 181 y SEQ ID NO: 182.

La mutación C74Y se encontró en un varón de 36 años que presentaba arco corneal y que había padecido un infarto de miocardio a los 34 años de edad. Este paciente tenía dos hijos de 2 y 8 años de edad con hipercolesterolemia grave con cifras de CT de 320 y 375 mg/dL respectivamente. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar de este paciente alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 17 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes de iniciar del tratamiento farmacológico hipolipemiante fueron: CT 449 mg/dL, c-LDL 367 mg/dL, TG 218 mg/dL y c-HDL 38 mg/dL. El tratamiento con simvastatina (40 mg/día) disminuyó su cifra de c-LDL a 270 mg/dL.

EJEMPLO 5: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 4B del gen del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 237 pb de la zona 3' del exón 4 (4B) por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex4BF (SEQ ID NO: 12) y Ex4BR (SEQ ID NO:13).

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación D200V

5

10

15

20

25

Esta mutación D200V (662A>T, GAC>GTC, Asp200Val) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 237 pb correspondiente al exón 4B del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando los reactivos del kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex4BF (SEQ ID NO:12) y Ex4BR (SEQ ID NO:13). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio observado A>T se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo

descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 240, SEQ ID NO: 241 y SEQ ID NO :242.

La mutación D200V se encontró en una familia con hipercolesterolemia autosómica dominante. El probando era una mujer de 43 años con historia familiar de hipercolesterolemia en la infancia y cuya madre y hermano presentaban niveles de c-LDL por encima del percentil 95. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar en esta paciente alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 8 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos bajo tratamiento farmacológico (Pravastatina, 40 mg/dL) fueron: CT 329 mg/dL, TG 73 mg/dl y c-HDL de 41 mg/dl y unos niveles de c-LDL de 273 mg/dL.

Análisis de la mutación S205C

.5

10

15

20

25

30

La mutación S205C (677C>G, TCT>TGT, Ser205Cys) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 237 pb correspondiente al exón 4B del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando los reactivos suministrados en el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex4BF (SEQ ID NO:12) y Ex4BR (SEQ ID NO:13). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio C>G observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ

La mutación S205C se encontró en una mujer de 39 años con historia familiar de hipercolesterolemia (madre y hermano con niveles de CT de 450 y 500 mg/dL respectivamente) y con 2 hijos con CT por encima del percentil 95. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, realizado a los 20 años, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 8 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 390 mg/dL, 150 mg/dL y c-HDL 35 mg/dL y unos

ID NO: 235, SEQ ID NO: 236, SEQ ID NO: 237 y SEQ ID NO: 238.

niveles de c-LDL de 325 mg/dL. El tratamiento con simvastatina (10 mg/día) disminuyó su cifra de c-LDL a 270 mg/dL.

EJEMPLO 6: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 6 del gen del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 179 pb del exón 6 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex6F (SEQ ID NO: 14) y Ex6R (SEQ ID NO: 15).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 μL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 μM de cada dNTP, 0,2 μM de cada desoxioligonucléotido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 56°C durante 1 minuto y elongación a 72° C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72° C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP): los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación 818del8

5 .

10

15

20

25

30

Esta mutación se pudo identificar por análisis de heterodúplex. La electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% del material de PCR amplificado del exón 6 cuando existe mutación muestra la presencia de dos banda heterodúplex de un aparente mayor tamaño molecular que las dos bandas homodúplex de 179 y 171 pb, fácilmente distinguibles en el gel después de la tinción con bromuro de etidio. Las dos bandas de los heterodúplex que se forman migran a velocidad mas lenta como consecuencia de la formación de los abultamientos entre las secuencias no apareadas.

Adicionalmente, esta mutación puede ser caracterizada por digestión del producto amplificado correspondiente al exón 6 del gen del rLDL con la endonucleasa de

restricción MaeIII; quince microlitros del material amplificado del exón 4B se hidrolizaron con 15 unidades de MaeIII en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Roche Diagnostics, Manheim, Germany). Los fragmentos que se obtuvieron tenían un tamaño de 118, 34 y 27 pb para el alelo normal y de 118 y 53 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169 y SEQ ID NO: 170.

La mutación 818del8 se encontró en una mujer de 69 años con dos hijos con cifras de CT de 382 y 304 mg/dL respectivamente y con evidencia de enfermedad cardiovascular prematura. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 10 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 530 mg/dL, c-LDL 439 mg/dL, TG 170 mg/dL y c-HDL 57 mg/dL. El tratamiento con cerivastatina (0,4 mg/día) disminuyó su cifra de c-LDL a 363 mg/dL.

Análisis de la mutación R279G

5

10

15

20

25

Esta mutación R279G (898A>G, AGA>GGA, Arg279Gly) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 179 pb correspondiente al exón 6 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se realizó en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex6F (SEQ ID NO: 14) y Ex6R (SEQ ID NO:15). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio A>G observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra.

Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 208, SEQ ID NO: 209 y SEQ ID NO: 210.

La mutación R279G se encontró en una mujer de 59 años con xantelasmas e historia familiar de hipercolesterolemia en padre y dos hermanos. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 8 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 384 mg/dL, c-LDL 314 mg/dl, con TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiante con simvastatina (80 mg/dl) redujo su concentración de c-LDL a 167 mg/dL.

EJEMPLO 7: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 8 del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 220 pb del exón 8 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex 8F (SEQ ID NO: 153) y EX8R (SEQ ID NO:154).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 μL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 μM de cada dNTP, 0,2 μM de cada desoxioligonucléotido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 min de desnaturalización a 96° C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 1 minuto, hibridación a 64° C durante 1 minuto y elongación a 72° C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72° C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación 1186+5 G>A

5

10

15

20

25

30

Esta mutación fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 220 pb correspondiente al exón 8 del gen del rLDL al analizar este fragmento en

pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando los reactivos del kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex4BF (SEQ ID NO:12) y Ex4BR (SEQ ID NO:13).

5

10

15

20

25

30

Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio G>A observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 197 y SEQ ID NO: 198.

relacionados familias no dos encontró en se Esta mutación hipercolesterolemia autosómica dominante. El probando de una de ellas era una mujer de 45 años que presentaba arco corneal, xantomas tendinosos, xantelasmas e historia familiar de hipercolesterolemia. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 21 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: Colesterol total (CT) de 411 mg/dL, c-LDL de 346 mg/dL y niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiante con Cerivastatina (0,2 mg/día) redujo su cifra de c-LDL a 222 mg/dL.

EJEMPLO 8: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 9 del gen del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 224 pb del exón 9 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex9F (SEQ ID NO: 20) y Ex9R (SEQ ID NO: 21).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 μL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 μM de cada dNTP, 0,2 μM de cada desoxioligonucléotido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 min de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 63°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación 1204 inst

5

10

15

20.

25

30

Esta mutación elimina un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción MboII. Quince microlitros del material amplificado del exón 9 se hidrolizaron con 15 unidades de MboII en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA). Los fragmentos resultantes de la digestión tenían un tamaño de 141, 45, 35 y 3 pb para el alelo normal y de 141, 45 y 39 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177 y SEQ ID NO: 178.

La mutación 1204insT se encontró en una niña de 12 años cuyo padre presentaba unos niveles de CT de 412 mg/dl y su hermano de 7 años un CT de 321 mg/dl. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 9 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: Colesterol total (CT) de 332 mg/dl., c-LDL de 267 mg/dl y niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiante con resinas (15 g/día) redujo su cifra de c-LDL a 248 mg/dl.

EJEMPLO 10: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 10.

Se amplificó un fragmento de 278 pb del exón 10 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los siguientes desoxioligonucleótidos Ex10F (SEQ ID NO: 22) y Ex10R (SEQ ID NO: 23).

La reacción de amplificación se llevó acabo en un volumen final de 50 μ L con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂,

200 μM de cada dNTP, 0,2 μM de cada desoxioligonucléotido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minuto de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 58°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos. al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación T433N

5

10

15

20

25

30

Esta mutación T433N (1361C>A, ACC>AAC, Tyr433Asn) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 278 pb correspondiente al exón 10 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se desarrolló en termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando los reactivos del kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex10F (SEQ ID NO: 22) y Ex10R (SEQ ID NO: 23). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio observado C>A se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165 y SEQ ID NO: 166.

La mutación T433N se encontró en un varón de 50 años con arco corneal y con historia paterna de hipercolesterolemia y una hija de 21 años con niveles de CT de 310 mg/dL. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del Med Ped de 6 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del inicio del tratamiento farmacológico fueron: CT 318 mg/dL, c-LDL 249 y con

concentraciones de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiante con lovastatina (20 mg/día) descendió su cifra de c-LDL a 199 mg/dL.

Análisis de la mutación T446I

. 5

10

15

20

25

30

La mutación T446I (1400C>T, ACC>ATC, Tyr446Ile) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 278 pb correspondiente al exón 10 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando los reactivos del kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex10F (SEQ ID NO: 22) y Ex10R (SEQ ID NO: 23). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio C>T observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 211, SEQ ID NO: 212, SEQ ID NO: 213 y SEQ ID NO: 214.

La mutación T446I se encontró en una mujer de 64 años con antecedentes de enfermedad cardiovascular prematura (angor a los 62 años) y con dos hermanos hipercolesterolémicos que habían sufrido un infarto de miocardio a la edad de 40 y 46 años respectivamente. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 9 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos bajo tratamiento farmacológico (Pravastatina) fueron: CT de 352 mg/dL, c-LDL de 281 mg/dl y niveles de TG y c-HDL normales. Posteriormente, el tratamiento hipolipemiante con Simvastatina (20mg/día) se disminuyó su cifra de c-LDL a 150 mg/dL.

Análisis de la mutación 1423delGC/insA

Esta mutación elimina un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción Mval. Quince microlitros del material amplificado del exón 10 se hidrolizaron con 15 unidades de Mval en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). Los fragmentos resultantes de la

digestión tenían un tamaño de 150 y 128 pb para el alelo normal y de 128, 87 y 63 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173 y SEQ ID NO: 174.

5.

10

20

25

La mutación 1423delGC/insA se encontró en un varón de 34 años con historia paterna de hipercolesterolemia. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 9 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: Colesterol total (CT) de 554 mg/dL, c-LDL de 422 mg/dl y niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiante administrado (Atorvastatina 10 mg/día) tan sólo disminuyó su cifra de c-LDL a 406 mg/dl.

EJEMPLO 11: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 11 del gen del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 194 pb del exón 11 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex11F (SEQ ID NO: 25) y Ex11R (SEQ ID NO: 26).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 μL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 μM de cada dNTP, 0,2 μM de cada desoxioligonucléotido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minuto de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 65°C durante 1 minuto y elongación a 72 °C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación [1587-5del5; 1587del31]

5

10 .

15

20

25

30

La mutación [1587-5del5; 1587del31] fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 194 pb correspondiente al exón 10 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex11F (SEQ ID NO: 25) y Ex11R (SEQ ID NO: 26).

Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. Esta deleción se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% tras la que pudieron observarse bandas de 194 y 158 pb correspondientes al alelo normal y mutado respectivamente. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO:263, SEQ ID NO:264, SEQ ID NO:265 y SEQ ID NO: 266.

La mutación [1587-5del5; 1587del31] se encontró en un varón de 43 años con arco corneal, historia de hipercolesterolemia en la familia (padre e hijo con hipercolesterolemia) y evidencia de enfermedad cardiovascular en la familiar (padre sufrió un infarto agudo de miocardio a los 50 años). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 9 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: Colesterol total (CT) de 345 mg/dL con niveles de TG de 160 mg/dl y c-HDL de 34 mg/dl. El tratamiento hipolipemiante combinada con Simvastatina (40 mg/día) y colestipol (10 g/día) disminuyó su cifra de CT a 208 mg/dl.

Análisis de la mutación G516X

Esta mutación (1609G>T, GGA>TGA, Gly516Stop) introduce un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción HphI. Quince microlitros del material amplificado del exón 11 se hidrolizaron con 15 unidades de HphI en un volumen final de 30 μl según las instrucciones descritas por el fabricante (NEB, Beverly, MA, USA). Los fragmentos resultantes de la digestión tenían un tamaño de 139, 43 y 12 pb para el alelo normal y de 81, 58, 43 y 12 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185 y SEQ ID NO: 186.

La mutación G516X se encontró en una mujer de 20 años con xantomas tendinosos e historia de hipercolesterolemia en la familia (madre y dos hermanos adolescentes con niveles de c-LDL por encima del percentil 95). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 17 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 476 mg/dL, c-LDL 403 mg/dl y niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiante con un inhibidor de la HMG-CoA reductasa disminuyó su cifra de c-LDL a 202 mg/dL.

20

25

30

15

5

10

Análisis de la mutación H562Q

Esta mutación (1749C>A, CAC>CAA, His562Gln) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 194 pb correspondiente al exón 10 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex11F (SEQ ID NO: 25) y Ex11R (SEQ ID NO: 26). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio observado C>A se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo

descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 216, SEQ ID NO: 217 y SEQ ID NO: 218.

La mutación H562Q se encontró en una mujer de 37 años con historia de hipercolesterolemia y enfermedad coronaria en la familia (padre con hipercolesterolemia e IAM a los 48 años e hijo de 13 años con 500 mg/dl de CT). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 9 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: Colesterol total (CT) de 350 mg/dL con niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiante con Atorvastatina (20 mg/día) disminuyó su cifra de CT a 333 mg/dl.

EJEMPLO 12: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 12 del r-LDL

Se amplificó un fragmento de 236 pb del exón 12 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex12F (SEQ ID NO: 155) y Ex12R (SEQ ID NO: 156).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 μL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 μM de cada dNTP, 0,2 μM de cada desoxioligonucléotido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 min de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 58°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación E579D

5

10

15

20

25

30

Esta mutación E579D (1800G>C, GAG>GAC, Glu579Asp) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 236 pb correspondiente al exón 12

del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex12F (SEQ ID NO: 155) y Ex12R (SEQ ID NO:156). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio G>C observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 231, SEQ ID NO: 232, SEQ ID NO: 233 y SEQ ID NO: 234.

La mutación E579D se encontró en un varón de 49 años con historia de hipercolesterolemia en la familia (padre con 450 mg/dl de CT, hermano y dos hijos adolescentes con niveles de c-LDL por encima del percentil 95). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 8 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 320 mg/dL, c-LDL 250 mg/dl y niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiante con Atorvastatina (10 mg/día) redujo su cifra de c-LDL a 187 mg/dl.

20 **Análisis de la mutación 1815del11**

5

10

15

25

30

Esta mutación se pudo identificar por análisis de heterodúplex. La electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% del material de PCR amplificado del exón 12 cuando existe mutación muestra la presencia de bandas de heterodúplex de un aparente mayor tamaño molecular que las dos bandas homodúplex de 236 y 225 pb, fácilmente distinguibles en el gel después de la tinción con bromuro de etidio. Las dos bandas de los heterodúplex que se forman migran a velocidad más lenta como consecuencia de la formación de los abultamientos entre las secuencias no apareadas. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193 y SEQ ID NO:194.

La mutación 1815del11 se encontró en 4 familias no relacionadas con hipercolesterolemia autosómica dominante. El probando de una de ellas, era una mujer de

69 años con arco corneal, evidencia de enfermedad cardiovascular prematura (angor a los 56 años) e historia de hipercolesterolemia en varios miembros de su familia (dos hermanos con CT de 700 y 435 mg/dL respectivamente). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 13 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos bajo tratamiento farmacológico (Simvastatina, 40 mg/día) fueron: CT 444 mg/dL, c-LDL 368 mg/dL y niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiante con Atorvastatina (30 mg/día) redujo su cifra de c-LDL a 225 mg/dL.

5

10

15

20

25

30

EJEMPLO 13: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 13 del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 215 pb del exón 13 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex13F (SEQ ID NO: 27) y Ex13R (SEQ ID NO: 28).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 μL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 μM de cada dNTP, 0,2 μM de cada desoxioligonucléotido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 min de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 59°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

EJEMPLO 14: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 14 del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 288 pb del exón 14 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex14F (SEQ ID NO: 157) y Ex14R (SEQ ID NO: 158).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 μL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 20 μM de cada dNTP, 0,2 μM de cada desoxioligonucléotido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 min de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 59°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Análisis de la mutación D686Y

5

1.0

15

20

25

30

La mutación D686Y (2119G>T, GAC>TAC, Asp686Tyr) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 288 pb correspondiente al exón 14 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex14F (SEQ ID NO: 157) y Ex14R (SEQ ID NO:158).

Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio G>T observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 223, SEQ ID NO: 224, SEQ ID NO: 225 y SEQ ID NO: 226.

La mutación D686Y se encontró en un varón de 31 años con xantomas tendinosos, arco corneal, evidencia de enfermedad coronaria prematura (angor) e historia de hipercolesterolemia en la familia (padre y varios hermanos con niveles de c-LDL por encima del percentil 95). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó

una puntuación según criterios del MedPed de 21 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 430 mg/dL y niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiante combinado con Atorvastatina (40 mg/día) y resina (5 gr/día) redujo su cifra de CT a 205 mg/dl.

5

10

15

20

25

30

EJEMPLO 15: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 15 del gen del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 243 pb del exón 15 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex15F (SEQ ID NO: 33) y Ex15R (SEQ ID NO: 34).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 μM de cada dNTP, 0,2 μM de cada desoxioligonucléotido y 1,5 unidades de Taq :····· ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 55°C durante 30 segundos y elongación a 72°C durante 90 segundos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación T740M

Esta mutación (2282C>T, ACG>ATG, Tyr740Met) introduce un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción NlaIII. Quince microlitros del material amplificado que incluía parte del exón 15 se hidrolizaron con 15 unidades de NIaIII en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (NEB, Beverly, MA, USA). Los fragmentos resultantes de la digestión tenían un tamaño de 247 pb para el alelo normal y de 247, 194 y 53 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se

visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 200, SEQ ID NO: 201 y SEQ ID NO: 202.

5

10

15

20

25

30

La mutación T740M se encontró en un mujer de 60 años con arco corneal, historia familiar de hipercolesterolemia y antecedentes de enfermedad cardiovascular prematura en la familia (padre muerto de accidente cerebrovascular a los 34 años). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 10 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 492 mg/dL y niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiante con atorvastatina (10 mg/día) disminuyó su cifra de CT a 251 mg/dL.

EJEMPLO 16: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 16 del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 273 pb del exón 16 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex16F (SEQ ID NO:159) y Ex16R (SEQ ID NO:160).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 μL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl2, 200 μM de cada dNTP, 0,2 μM de cada desoxioligonucléotido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 min de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 63°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 2 minutos, al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

Análisis de la mutación V766E

5

10

15

20

25

30

La mutación V766E (2360T>A, GTG>GAG, Val766Glu) fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 273 pb correspondiente al exón 16 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex 16F (SEQ ID NO: 159) y EX16R (SEQ ID NO: 160). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio T>A observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 243, SEQ ID NO: 244, SEQ ID NO: 245 y SEQ ID NO: 246.

La mutación V766E se encontró en una mujer de 58 años con xantomas tendinosos en codos, xantelasmas, arco corneal, y con historia familiar de hipercolesterolemia. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 12 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 420 mg/dL, c-LDL de 324 mg/dL y con niveles de TG y c-HDL normales.

Análisis de la mutación 1771T

Como esta mutación (2375T>C, ATT>CACT, Ile771Thr), no cambia el mapa de restricción, se diseño y sintetizó un desoxioligonucleótido con una base desapareada que crea un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción HincII en presencia del alelo mutado y que desaparece en presencia del alelo normal.

Se amplificó un fragmento de 142 pb del exón 16 por la técnica de PCR utilizando el desoxioligonucleótido Ex16R (SEQ ID NO: 160) y el desoxioligonucleótido con la base desapareada MutI771TF (SEQ ID NO: 161).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, 0,2 μ M de cada desoxioligonucléotido y 1,5 unidades de Taq

ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 61°C durante 1 minuto y elongación a 72 °C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos. Quince microlitros del material amplificado de parte del exón 14 se hidrolizaron con 15 unidades de HincII en un volumen final de 30 μl según las instrucciones descritas por el fabricante (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA). Los fragmentos resultantes de la digestión tenían un tamaño de 142 pb para el alelo normal y de 121 y 21 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 204, SEQ ID NO: 205 y SEQ ID NO: 206.

La mutación I771T se encontró en una mujer de 60 años con evidencia de enfermedad coronaria prematura en la familia e historia familiar de hipercolesterolemia. El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 21 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 422 mg/dL, c-LDL 368 mg/dL y unos niveles de TG y c-HDL normales.

20

25

30

15

5

10

Análisis de la mutación 2389+3 A>C

La mutación 2389+3 C>T fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 273 pb correspondiente al exón 16 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y los cebadores Ex16F (SEQ ID NO: 159) y Ex16R (SEQ ID NO:160). Los fragmentos generados por la reacción de secuenciación se analizaron en un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. El cambio C>T observado se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra.

Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO:259, SEQ ID NO:260, SEQ ID NO:261 y SEQ ID NO:262.

La mutación 2389+3 C>T se encontró en un varón de 36 años con xantomas tendinosos en tendón de aquiles y extensores de la mano e historia de hipercolesterolemia en la familia (madre, hermano y un hijo con niveles de c-LDL por encima del percentil 95). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 18 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 450 mg/dL y niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiante con Atorvastatina (20 mg/día) redujo su cifra de CT a 259 mg/dl.

Análisis de la mutación 2389+4 A>G

5

10

15

20

25

30

Como esta mutación no cambia el mapa de restricción, se diseñó y sintetizó un desoxinucleoótido con una base desapareada que crea una un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BshNI en presencia del alelo mutado y que desaparece en presencia del alelo normal.

Se amplificó un fragmento de 194 pb del exón 16 por la técnica de PCR utilizando el desoxioligonucleótido Ex16F (SEQ ID NO: 159) y el desoxioligonucleótido con la base desapareada Mut2389+4 A>GR (SEQ ID NO: 160).

La reacción de amplificación se llevó acabo en un volumen final de 50 µL con 500 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 μM de cada dNTP, 0,2 μM de cada desoxioligonucléotido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 61°C durante 1 minuto y elongación a 72 °C durante 2 minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

Quince microlitros del material amplificado del exón 16 se hidrolizaron con 15 unidades de BshNI en un volumen final de 30 µl según las instrucciones descritas por el fabricante (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA). Los fragmentos resultantes de la digestión tenían un tamaño de 194 pb para el alelo normal y de 175 y 19 pb para el alelo mutado. Estos fragmentos se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 189 y SEQ ID NO: 190.

5

10

20

25

La mutación 2389+4 A>G se encontró en once familias no relacionadas con herencia de la hipercolesterolemia autosómica dominante. El probando de una de ellas, era una mujer de 22 años con xantomas tendinosos, antecedentes de enfermedad cardiovascular prematura en la familia (padre con hipercolesterolemia e infarto de miocardio a los 29 años). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 17 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 356 mg/dL, c-LDL 293 mg/dL con niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiante combinado con atorvastatina (40 mg/día) y resina (5 gramos/día) disminuyó su cifra de c-LDL a 227 mg/dL.

EJEMPLO 17: Identificación de mutaciones localizadas en el exón 17 del gen del r-LDL.

Se amplificó un fragmento de 242 pb del exón 17 por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los desoxioligonucleótidos Ex17F (SEQ ID NO: 35) y Ex17R (SEQ ID NO:36).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 μL con 300 ng de ADN en una mezcla de 20mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 μM de cada dNTP, 0,2 μM de cada desoxioligonucléotido y 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Los ciclos de amplificación fueron: 10 minutos de desnaturalización a 96°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 58°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante dos minutos. Al final de los ciclos se realizó una extensión a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR fueron analizados por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP). Los fragmentos que mostraron un patrón anómalo por SSCP fueron secuenciados utilizando un secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA). La presencia de una mutación identificada por secuenciación se analizó posteriormente por análisis de restricción y con el dispositivo descrito ("biochip").

<u>Análisis de la mutación 2544insC</u>

Esta mutación fue caracterizada mediante secuenciación automática del fragmento de 242 pb correspondiente al exón 17 del gen del rLDL al analizar este fragmento en pacientes con diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar. La reacción de secuenciación se desarrolló en termociclador PE Gene Amp System 9700 utilizando el kit CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing con Quick Start de Beckman (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) con los cebadores Ex17F (SEQ ID NO: 35) y Ex17R (SEQ ID NO: 36) la posterior electroforesis en secuenciador automático CEQ 2000XL DNA Analysis System de Beckman. Esta deleción se confirmó mediante secuenciación automática de un segundo producto de PCR de la misma muestra. Alternativamente, esta mutación puede analizarse con el dispositivo descrito ("biochip") utilizando en el soporte los oligonucleótidos SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 252, SEQ ID NO: 253 y SEQ ID NO: 254.

La mutación 2544insC se encontró en un varón de 37 años que había sufrido un infarto de miocardio, xantomas tendinosos, arco corneal, e historia de hipercolesterolemia en la familia (su padre falleció prematuramente de infarto de miocardio). El diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar, alcanzó una puntuación según criterios del MedPed de 21 puntos. Las concentraciones plasmáticas de lípidos antes del tratamiento farmacológico fueron: CT 444 mg/dL, c-LDL 379 mg/dL y con niveles de TG y c-HDL normales. El tratamiento hipolipemiante con Atorvastatina (40 mg/día)redujo su cifra de CT a 282 mg/dL.

5

10

15

20

REIVINDICACIONES

1.- Secuencia génica correspondiente a SEQ ID NO:1 que comprende al menos una de las siguientes mutaciones: T433N, 818del8, 1423delGC/insA, 1204insT, 451del3, G516X, 2389+4A>G, 1815del11, 1186+5G>A, T740M, I771T, R279G, T446I, H562Q, C74Y, D686Y, G(-2)R, E579D, S205C, D200V, V766E, L(-6)P, 2544insC, C42Y, 2389+3A>C, [1587-5del5;1587del31], de aplicación en métodos de diagnóstico extracorpóreos e in vitro, de la hipercolesterolemia familiar.

10

15

20

25

- 2.- Secuencia génica según la reivindicación 1 que comprende además, alguna de (-23)A>C, 1054 del11, 108delC, 1197del9, 1207delT, las siguientes mutaciones: 1432delG, 191-2delAinsCT, 2184delG, 231delC, 2399del5/ins4, 313+1insT, 338del16, :.... 510insC, 675del15, 684dup12, 941-39 C>T, C127R, C195R, C255G, C319Y, D157G, D630N, E291X, H635N, N59K, T41M, W515X, Y379X, Y421X, 2393del 9, (-42) C/G, (-49) C/T, 1045delC, 1061-8 T>C, A378T, C358R, 1358 + 1 G/A, 1706-10 G>A, 1845 + 1 G/C, 2085del19, 211del G, 2140 + 5 G/A, 2207insT, 2390-1G/C, 313+1 G>C, 313+1G/A, 313+2GinsT, 518 del G, 7delC, 872delC, 884delT, 920ins4, A519T, C113W, C255X, C281Y, C297F, C347Y, C371X, C646Y, C677Y, C68W, C74G, C95R, D151N, D200G, D200Y, D280G, E10X, E246A, E256K, F634L, G322S, G352D, G571E, N543H, N804K, Q12X, Q133X, Q357P, Q427X, Q71 E, R395Q, R574W, R612C, S156L, S205P, T413K, T705I, V502M, W(-18)X, W541X, D679E, 1359 -1 G>A, 681ins21, C122X, V408M, G528D, D412H, N619N, E80K, L534P, 621S, C356Y, R329X, G248D, C201Y, 313+5G>A, C358Y, C331R, D157N, V776M, 664L, W462X, Q328X, L584P, R395W, G314V, W469X, P678L, R612H, R236W de aplicación en métodos de diagnóstico extracorpóreos e in vitro, de la hipercolesterolemia familiar.
- 3.- Secuencia génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 que comprende, además, alguno de los siguientes polimorfismos: 81T>C BstUI Exón 2, 1060+10G>C SmaI Exón 7, 1171G>A StuI Exón 8, 1413G>A DdeI Exón 10, 1617C>T BstNI Exón 11, 1725C>T SSCP Exón 12, 1771C>T HincII Exón 12, 1959 T>C AvaII Exón 13, 2232G>A MspI Exón 15, de aplicación en métodos de diagnóstico extracorpóreos e in vitro, de la hipercolesterolemia familiar.
- 4- Uso de la secuencia génica de la reivindicación 1 en el diseño y la preparación de sondas oligonucleotídicas capaces de hibridar con alguna de las siguientes mutaciones: T433N, 818del8, 1423delGC/insA, 1204insT, 451del3, G516X, 2389+4A>G, 1815del11,

1186+5G>A, T740M, I771T, R279G, T446I, H562Q, C74Y, 686Y, G(-2)R, E579D, S205C, D200V, V766E, L(-6)P, 2544insC, C42Y, 2389+3A>C, [1587-5del5;1587del31].

- 5.- Sondas oligonucleotídicas capaces de hibridar con cualquiera de las mutaciones comprendidas en la secuencia génica de la reivindicación 1.
- 6.- Sondas oligonucleotídicas según la reivindicación 5 seleccionadas entre al menos unas de las SEQ ID NO: 153 a SEQ ID NO: 266.
- 7.- Uso de las sondas de la reivindicación 5 en un método extracorpóreo de detección in vitro de mutaciones del gen r-LDL para el diagnóstico de la hipercolesterolemia familiar.
- 8.- Uso de las sondas de la reivindicación 6 en un método extracorpóreo de detección in vitro de mutaciones del gen r-LDL para el diagnóstico de hipercolesterolemia familiar.
- 9.- Dispositivo de ensayo que comprende un soporte al que se acopla alguna de las sondas oligonucleotídicas de la reivindicación 5, de aplicación en la diagnosis de la hipercolesterolemia familiar.
- 10.- Dispositivo de ensayo que comprende un soporte al que se acopla alguna de las sondas oligonucleotídicas de las reivindicación 6, de aplicación en la diagnosis de la hipercolesterolemia familiar.
- 11.- Dispositivo de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 9 6 10 que comprende un soporte al que se acoplan además alguna de las sondas seleccionadas entre SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 152, de aplicación en la diagnosis de la hipercolesterolemia familiar.
- 12.- Método extracorpóreo de diagnóstico in vitro de hipercolesterolemia familiar caracterizado por detectar en una muestra biológica de un individuo algunas de las mutaciones de SEO ID NO:1, descritas en la reivindicación 1.
- 13.- Método extracorpóreo de diagnóstico in vitro de hipercolesterolemia familiar caracterizado por detectar en una muestra biológica de un individuo algunas de las mutaciones de SEQ ID NO:1, descritas en la reivindicación 1, en combinación con alguna de las mutaciones de dicha SEQ ID NO:1, descritas en la reivindicación 2.
- 14.- Método extracorpóreo de diagnóstico in vitro de hipercolesterolemia familiar caracterizado por detectar en una muestra biológica de un individuo algunas de las

10

5

15

20

25

mutaciones de SEQ ID NO:1, descritas en la reivindicación 1, en combinación con alguno de los polimorfismos de dicha SEQ ID NO:1, descritos en la reivindicación 3.

15.- Método de diagnóstico según las reivindicaciones 12 a 14 que comprende amplificar fragmentos de ADN que contengan las mutaciones de la reivindicación 1, sólas o en combinación con las mutaciones de la reivindicación 2 y/o los polimorfismos de la reivindicación 3, por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando para ello alguno de los desoxioligonucléotidos seleccionados entre SEQ ID NO: 153 a SEQ ID NO: 266 o combinaciones de los mismos, sometiendo los productos PCR a un análisis por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP), secuenciando aquellos fragmentos que presenten un patrón anómalo por SSCP para detectar las mutaciones que serían identificadas con posterioridad mediante análisis de restricción o mediante el dispositivo de ensayo de las reivindicaciones 9 a 11.

amplificar fragmentos de ADN que contengan las mutaciones de la reivindicación 1, sólas o en combinación con las mutaciones de la reivindicación 2 y/o los polimorfismos de la reivindicación 3, por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando para ello alguno de los desoxioligonucléotidos seleccionados entre SEQ ID NO: 153 a SEQ ID NO: 266 o combinaciones de los mismos, conjuntamente con alguno de los desoxioligonucleótidos seleccionados entre SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 152, sometiendo los productos PCR a un análisis por la técnica de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP), secuenciando aquellos fragmentos que presenten un patrón anómalo por SSCP para detectar las mutaciones que serían identificadas con posterioridad mediante análisis de restricción o mediante el dispositivo de ensayo de las reivindicaciones 9 a 11.

20

5

10

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> EFARMES, S.A.

<120> " CERTIFICADO DE ADICION A LA PATENTE 200300206 PARA UN PROCEDIMIENTO Y DISPOSITIVO DE DETECCIÓN DE MUTACIONES EN SECUENCIAS GENICAS AISLADAS DEL RECEPTOR DE LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD (LDL-R) ASOCIADO CON LA HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR".

<130> P-100019

<160> 266

<210> SEQ ID NO.: 1

<211>60.000

<212> polinucleótido

<213> humano

<220>

<221> gen

<223> rLDL

<400>

aaaagatggt gtatccattc aatggaacat tatttggcct ttaaaaggaa ggaaattctc 60 actgagcata gtggtttatg cctgtaatcc cagcactttg ggaggctgag gcagggggga 120 gggggcggtt cacctgaggt caggagttca agaccagcct ggccaacatg gtgaaatccc 180 gtctctacta aaaatacaaa aaaattagcc gagtgtggtg gcacacacct gtaagccagg 240 ctacacggga gactgaggca ggagaatcgc tggaacccgg.gaggcagagg ctgcagagag 300 ccgagattgc gtcactgcac tccagcctgg gtgacagagc gagactcttg tcttaaaaaa 360 aaaaagaagg aaggaaggaa ggaaggaagg aagttctgac acaggctcca acacagatgt 420 tatgctcagt gaaataagcc agacatgaaa ggacaaatac tgcctgatct cattcataag 480 aggtccctag aattgtagaa tggtgtgtgc cacgggctgg gagggggtgt ggccagagtt 540 tcagtttggg aagttgagaa tgttctggag atggatggcg gtagtggtgg ttgcacaact 600 gtgtgaatgc gcttaatgcc tctgaattgt gcagttacaa gtggttcgga tgggccgggc 660 geggtggctc atgcctgtaa teccagcact ttgggaggcc gaggcaggtg gatcatgaga 720 tcaggagatc gagaccatcc tggctaacac ggtgaaaccc catctctact aaaaaataca 780 aaaaattagc caggcatggt ggtgggcacc tgtagtccca gctacttggg aggcggaggc 840 aggagaatgg cgtgaacacg ggaggcagaa cttgcagtga gccgagatca cgccactgca 900 ctccagcctg ggcgacagag tgagactccg tctaaaaaaa aaaaagtggt taagatgggc 960 cgggcatggg ggatcacgct tgcaatccca acactttggg aggctgaggt gggtgattac 1020 gaggtcagga gttcgagacc agcctgacca ccatggtgaa accccgtctc tactaaaagt 1080 acaaaattag ccgggtgtcg tggcacacgt ctgtaatccc agctactggg gaggctgagt 1140 tgggaggatc acctgagccc agggaggtcc aggctgcagc aagccatgat tgcaccactg 1200 cactccagcc tgggtgagag agtgagaccc tgtctccaaa caaacacaca tgaaaaacag 1260 attttttttg ccaggtgcag tggctcacac ctgtaatccc agcactttgg gaggccaagg 1320 cgggtggate acgaggteag gtgactgaga gcatectgge taacacggtg aaaccetgge 1380 tctactaaaa atacaaaaat ttagccgagc atggtggtgg gcacctgtag tcccagctac 1440 tcgggaggct gaggcaggag aatggcatga acctgggagg cggagcttgc agtgagctga 1500 gatcacgcca ctgcactcta gcctggggga cacagcaaaa ctgtctcaaa aaaaaaaaa 1560. aaggtttttt taatttaaaa aggaaagaaa aggagagtgc tcgtgtggca ggcacctagc 1620 cctgtccage gcaccctgag acagggatga tgtctcctcc ttgacctaag accacaagtt 1680 ctaaccaatt caaccgagga cagagcccca attccaggca gggcaatggg gtcgccttgt 1740 gaactaagat gcagatggag aagagcagac acagacacag gtcttggggc ccctgcaggg 1800 gtttctcact ggctttttcc ccctggattc ctatgggttc tggggaacag agttaggtcg 1860 gctggcaaga cagatgcatg aggctgtggc gcccttgaca ttgagccgga gggccagagt 1920 tcgtcattgc tgacgcagag aagctgggag ccaaggttag ccagatggtt tggaggagtt 1980 ttaaacaatc ttttcttttc tttctctttc catctgtctg tccttctttc ctcccttcct 2040 gccccctttc ttttctcctt tctttccttc ctctctcctt cctccctttt tttcttttt 2100 tttggttttc tttttgtatt agtattatta ttttttagac agggtcttgc tctgttgccc 2160 aggctggagg gcagtggcac gatcacagct cagtacaccc tcaaccttct gggttcaagc 2220 aatcctcctg ccttggcctc ccaggtagct gggactacag gcgtgtgcca ccacacctgg 2280 ttaatttttt tttttttga gacggagtct tgctctgtca cccaggctgc agtgcagtgg 2340 cgtgatctcg gctcactgca acctccacct cccgggttca agcgatcctc ctgcctcagc 2400 ctcccgagta gctgggatta cacgcgcccg ccaccaagcc cggctaattt ttttattttt 2460 agtagagaca gagtttcacc acgttggcca ggctcgtctc aaactcctga cttagtgatc 2520 tacccacctt ggcctctcaa agtgctggga ttagaggcgt gagccaccat gcgcagccaa 2580 tttttgtatt tttagtagag atggggtttc accatgttgg tcagtctggt ctcgaactcc 2640 tgacctcaag tgatccacct gcctcagcct cccaaagtgc tggaattaca ggcatgagcc 2700 accgcgccca gccctcttaa ccatttttaa gtgcacagtt cagcagcatt aagcacattc 2760 acattgttgt gcaaccatca gccccgtcc atctccagct ttctcttttt ttttgtttgt 2820 tttgagacag ggtcttactc tctcgcccag tatagagtgc agtggtgcgg tcttggctcg 2880 ctgcaacctc tgccttccag gttcaagcta ttctcctgcc tcagtctccc cagtagctgg 2940 gattacagac acacatcacc acgocctgct aattattttg.catttttagt agagatggtg 3000 tttcaccata ttggccaggc tgatcttgaa ctcctggcct caagtggtct gctccaaact 3060 gctgagatta cagccgtgag ccactgctcc cagccatctg cacctttctc atcttcccaa 3120 atgtaactat gtccccgtga aacactcact ccccattcca cctccccagc ccctggcacc 3180 ccccatttta ttctggtgct aggggaattt caaaccaggc aagtctcaac acatgctcga 3240 gtgtaagaac cagcccacag cctcgttccc taatcacggt caaaccagaa ttctactcca 3300 ggttctactc tgtgaatctg ctttctgtga atctgttact ctggggaccg cctataagtt 3360 gaatcctaca gtgtctccac ttcagtgact ggcttatttc acttttctcc tctttattta 3420 tgagacaaaa tttcgctctt gttgctcagg ctggaatgca atggcgtgat ctcggctaat 3480 ttttttgtat ttttagtaga ggcggggttt caccatgttg gccaggctgg tctcgaactc 3540

ctgacctcag acgatccact ttggccttcc aaagtgctgg gattacaggc gcggcccacc 3600 tttctcctct taatcacaca ggtaatccat acatacgaca ttctttttt tttttgacac 3660 ggagtettae tetgteacet aggetggagt geagtggege aatettgget caetgeaace 3720 totgcctccc aggatcaagc aattotcctg cotcagcotc otgagtagct gggattacag 3780 gtaaccatca ccacacctgg ctaaattttg tatttttagt agagacgggg tttcaccacg 3840 ttggccacgc tggtattgaa ctcctggctt caagtgatct tcctgtctcg gtctcccgaa 3900 gtgctgggat tacaggaatg agccactgtg cccggccaat acgacatctg tgcaatgaag 3960 tgcaacatat aagacaccct teececaccc actgeececa ceacegeece caegeecea 4020 ccccatctc cagatcagaa cctggggctg tgcaatttta aacgttgtag ccacttgcta 4080 cttgggtagt tgaagttcag tctcagccag gttggagtcc tggactctgg cccctctttt 4140 atttttattt tttattttt tttgagacag agtctcgctc tgtcgcccag actggagcgc 4200 agtggtgcga tctcggctca ctgcaagetc tgcctcctga gttcacgcca ttcccccgcc 4260 teagectece gageagetgg gaetacagge gecegecace acaceegget aatttettgt 4320 attttttagt agagatgggg tttcaccctg ttagccagga tggtctagat ttcctgacct 4380 tatgatccgc ctgcctcggg cctcccaaag tgctgggatg acaggagtga gccaccgcgc 4440 ccggcctctt ttttttttt tagacagtct ctgtcaccca ggctagagtg cgatggtgcg 4500 atctcggctc actgcaacct ccaccttccg ggttcaagcg attctcctgc ctcagcctcc 4560 tgagtatctg ggattacagg tgcctgtgac cacgcccggc tgatttttgt atttttagta 4620 gagacggggt ttcaccacat tggtcaggct agcctcaaac tcctgacccc gtgatccttc 4680 cgcctcagcc tcccaaagtg ctgggattac aggactctgg cccatcttgg ctgctgccaa 4740 tgtccttcct tctatcttgg tttttccaca gttacgcaca tgccagataa cggcgagtct 4800 gttccccagc aactgcaacg gatctgccca ccactgggaa atggaagacc ttgcagccca 4860 ggtctttgta gaccaagatt agattgtggt caacaaacac ctgaccttgg cctttggaac 4920 catcagccat gtcagctaaa ataaaagcag aatctggctg ggcgcagtgg ctcacgcctg 4980 taatcccagc actttggggg gctgaggtgg gcagaccacc tgaggtccgg cgttctagac 5040 cagcctgacc aatatgatga aaccccgtct ctactaaaca tacaaaaatt agctgggcat 5100 ggtggcgggc acctgtaatc ccagctactc gggaggctga ggaaggagaa ttgcttgaac 5160 cetggaggea gaggttgcag tgagccgaga ttgcgccact gcactccaac ctggactgca 5220 gaacaagact ctgtcccaaa agcagataaa taaaaataaa taaaaataaa aatatggccg 5280 ggcatggtgg ctcacacctg taatcccaac actgggaaga tgaggcgggc agatcacgag 5340 gtcagggatt cgagaccagc ctggccaaca tggtgaaacc ccgtctctac taaaaataca 5400 aaaattagcc gggcatgatg ctgcatgcct gtaatcccag ctactctgga ggctgaggca 5460 ggagaatcgc ttcatcccgg gaggtggagc ttgcagtgag ctgagatcgc gccactgcac 5520 tctagcctgg gcaaaagagt gagactccat cgcaagaaaa aaaaaaaaa aagctgcaag 5580 ctctgtctcc cgggttcaag tgattctcct gcctcagcct tccaagtagc taggattata 5640 cgcgcccgcc accatgcctg gctaattttt gtatttttag tagagatgcg gtttcaccat 5700 gttggccagg ctggtctcaa actcctgacc tcacgtgatc cacctgcctc ggcctcccag 5760 agtgctggga ttacaggtgt gaacccctgc gcctggccaa gaaaagttgc ttgaatgaag 5820 agtaaataga agacccagaa agaaatgatt cgtccgagga aggtcacaga agcaacgtaa 5880 tcaagatgga aatctgactc ttcctaattt tggccagact tcccatccct ccaaagcttt 5940 ccagactett ccagateatt ctagatattt ccagaaatea ttegtgaaat ctaactagga 6000 gtagtctgta aacaatgtgt ttcacacaga tacaattcat aaacgatgag aagacaagga 6060

cacttcatga atgaaatttt tacggccggg tatgttggct cacgcctata atcccaggac 6120 tttggaagac ccaggcagga ggattgcttg agtccaggag ttcaagacca gtctgggcca 6180 catagtgaga ccctgtcgct acaaaaaatt taaaaattag gtagatatgg tggtgtatgc 6240 ctctagtttt agctttttg gaggctgaag caggaggatc tcttgagccc aggaggttga 6300 gctgcaatga gctacgattg aactactaca ctccagtctg ggtgacagag aaagaggctg 6360 cctcaaaaaa ataaaaataa aaaaataagg ccggacgcgg tggctcacgc ctgtaatccc 6420 agcactttgg gaggctgggg tgggcagacc acgaggtcag gagatcgagg ccatcctggc 6480 caacatgatg aaaccctgtc tctactgaaa acacaaaaat tagctgggcg tggtggcgta 6540 tacctgtaat cccagctact cgggaggctg aggcaggaga atcacttgaa ccagggagtc 6600 agaggttgca gcgagaggag attgtgccac tgcattccag cctggcaaca gagcaagact 6660 ccgtctcaaa aaagaaacaa caacagcaac aacaacaaaa aaaacataaa aaagttcggg 6720 cacggtggct cacacctgta atcccagcac tttgggaggc caaggtgggt agatctcttg 6780 aggtcaggag ttcaagacca gcctggccaa caaacatggt gaaaccccgt ctctactaaa 6840 aatacaaaaa gtagccgggt gtagtcccag ctactcggaa ggctgaggca ggagaatcgc 6900 ttcaacctgg gagatggaag ttgcagtgaa ctgagattgc gccactgggt gacagagtaa 6960 gactcttgtc tcaaaaaaaa aaaaagaaag aaagtttaat ttaatgattc aaataatgac 7020 ctgctcgaga gataaatata aagtctaacg taagaggtgt atactttttc ctctgtcctg 7080 ctgtcctcgc cccacctcac cccaagtccc aacctgattg atcagtctcc tttccctctg 7140 gtagececae teccatgace gaacegagaa gteatgeace egeataagaa etetaatttt 7200 ttttttcaaa gtcttctcac tgccccaaaa atagtttctt tcattcccag gggatgtgaa 7260 agtgtctctc ccaattttat ttcaacctcc cagcgttcca cacatatgcc ttgcctcagc 7320 cagctttcac tgatctgcca tttccacctc ggcgctgctc ctacctgcgg aaatcctgtc 7380 catccatagt ctgatttctg ttgttccaga acattcttt ttttttcccc tggaacattc 7440 tttaagatac ctcaataaat gaaaccagag ggtatagagc agtatgaatg ggtactacaa 7500 tgtacagggg gaaatggagg ggaatatgat atacteteet cettgtatat gettagaatg 7560 ttctagaagg atatgcttaa aaggttagca gtcctggcca ggcgtggtgg ctcacgcctg 7620 taatctcagc actttgggat gccaacgcgg acggatcaca aggtcaggag ttctagatca 7680 gcctgaccaa tatagtgaaa cctcatcttt actaaaaata caaaaattag ccgggtacgg 7740 tggcatgtgc ctgtagtccc agetactttg gaacctgagg caggagaatc gettgaactc 7800 gggaggcaga ggttgcagtg agccgagact gtgccattgc actgcagcct gggtgacaga 7860 acaggactcc gtctcaaaaa aaaacaaaaa aggtcagcag tcttaattgt cagagggcag 7920 gggacctgca tgggatggag gtttttccat gtgtccacct tttgagccct tttgcttttt 7980 ttttttaaat ctttttattg tagcaaaata gatataaaat ttaccctttt tttttttgag 8040 acagggtctc actctgttgc ccaggttgga gtgcagtggc atgatcttgg ctcactgcag 8100 cctctgcctc ctgggttcaa gcgattttcc tgcctcagcc tcccgagtag ctgggattac 8160 aggtgcttgc caccataccc ggctaatttt gtatttttag tagagacggg gttacgccaa 8820 gttggccaag ctggtcgcaa actcctgacc tcaagtgatc cgccccctc ggcctcccaa 8280 agtgctggga ttacaggcag gagccaccac gctcagccct aaaatttacc atattaacca 8340 ttttcaagtt cagaggcatt aaagtatact cacattgttg ttcaactgtc accactactc 8400 acctgcagaa gtttttcatc ttgcaaagtg aaaaccccat acccaatttc ccgttcttcc 8460 tctcagcccc tggtaatcac tattctactt tttgtctact ttttgtatga atttgcctat 8520 tctaggacct aatagaagtg gagtcaaacc tgtttgtcct tttgtggctg gcttatttca 8580

cccggcctta tatcctcaag gtttatccat gttggaggat gcctgaattt ccttgttttt 8640 aaggctaaat tttattctat tatattaata tgtcatattt tgtttatcct gatggacact 8700 tgggttgatt ccacctttgg ccattttgaa gaagcttcta tgtacatggt atacacatat.8760 atctttgggt ctctgctttc aatgcttttg gggatatttc agatgtggaa tttctggatt ataaggcaat ttttttttt gagacagact ctcgctcttg tcgcccaggc tagaatgtgg 8880 8940 tggtgtgatc tattttttt tttttttga gatggagtct cgctctgtcg cccaggctgg 9000 agtgcagtgt cacgatetea geteactgea ageteegeet eecaggtteg tgecattett 9060 atgecteage eteccaagta getgggacea cageegeeca ceaceteace eggetaattt 9120 ttgtattttt agtagagaca gggtttcact atgttggcca ggatggtctc gatctcctga 9180 cctcgtgatc cgcctgcctc ggcctcccaa agtgctggga ttacaggcgt gagccactgc acceggetgg tgtgatettg getegetgea acctetgeet eccaggitea agegatiett 9240 9300 gtgcctcagc ctctccgcag ctgggactac aggtgtgcgc cactgtgccc agctactttt 9360 taaaaatata tgtgtattta ttatactttt aagttctggg atacatgtac agaacgtgca 9420 ggtttgttac ataggtatac atgtgccatg gtggtttgct gcacccatca accggtcatc 9480 tacattaggt atttctccta atgctatccc ttccctagcc ctccactctc ccggtttttt 9540 gttttgtttt gttttgttgt tttgttttta gtagagacag ggtctcacca tgttgcccag 9600 gctagtcttg aactcctgac ctcaagtgat ccgcccacct cagcctccca aagtgctggg 9660 attacaggtg tgacccacta cactcggcct tattttcact tatttatgca attttcacta 9720 ttgctatatt ctaggaggca ctgtggaatt gcactgtgga attttagtat tgctgtattt 9780 cagcaagcca tgaggtctgt cagcacacgg ctttgggcat tttgtgaaga taactgatgc 9840 cagctgagcc aaggcaggtt cctgattcca cccactggca ggcaccgagg tctctgctgt 9900 tactgatggt ttctctgtgg attgatgggc ttaaggccag accacagctg caatggctca 9960 cctctgccaa aggccaggct cgttggggca gagacctatt ccggactgag cctcctggtg 10020 aattagagag gtagaaaatg ggaggacggg ggcaggtggg ctattacagc gaggaaaatg 10080 cccaccctga gttgtattag ataactttgg gagttcagga actttccaat aaagtgggtt 10140 ccacagcagg attacttact gactecctaa tagaaagaag gcaggcacag gccgggcgtg 10200 ttggctcatg tctgtaatcc cagcacgttg ggaggctgag gcgggtggat cacaaggtca 10260 ggagatccag accatcctgg ctaacaaagt gaaaccccgt ctctactaaa aatacaaaaa 10320 attaggctgg gcgtggtggc tcgtgcctgt aatcccagca ctttgggagg ctgaggcggg 10380 cggatcacga ggtcaggaga tcgagaccgt cctggctaac acggtaaaac cccatctcta 10440 ctaaacatac aaaaaaaat tagccaggtg tggtggcggg cgcctgtagt cccagctact 10500 caggaggctg aggcaggaga gtggtgtgaa ctcgggaggc gcagcttgca gtgagccgag 10560 actgcgccac tgcactccag cctgggcaac agacagagac tccgtctcaa aaaaaaaaa 10620 aaaaaataca aaaaattagc caggcgtggt ggcacgtgca cgtgactgta gtcccagcta 10680 cttgggaggc tgaggcagga gaattgtttg aacccgggag acggaggttg cagtgagccg 10740 agatogogoc actgoactoc agoctgggtg acagagotag actcogtoaa aaaacaaaaa 10800 acaaaaaaca aaaaaacaaa aaaaaaaaaa cagcaggaac tggcaggtct tccctgaaga 10860 gataaaaaaa aaaaaatgca gttgcaacac aaaagcagcc acagagaaaa gcaaacccat 10920 atatggtatt tattatgcac cgagtgtggc tctaatcact ttttttttt taattgagag 10980 acagcctggc tctgttgatt gggctggagt gcagtggcgc gaccgtagct cattgcagcc 11040 tcaacctcct tggctcaagc aatcctccta cctcagcctc ctgagtagct gggaccacag gtgtgagcca ccacgcctgg ctaattgttt ttttttttt tgtagagaca gggtctcact 11100 atgtggccca ggctggtttc caactcctgg gctcaagtga tcctcccacc tctgcctccc aaagtgetgg ggattacagg catgageeac etegeetgge etetagtege tttatatatt 11220 11280 ttaacttaat cettacaaga geeetgtgag etagttacag gageacaaat ggaaaccaag aaacagaaaa atttatcagc atgactcagt cctcagagcc atgtatggcc gtgtccgtgc 11340 atggcaggca ggtcaggggc ctggggaacg ctgttctgga aaccttggcc aggccttggc 11400 11460 accogaggaa tgtgcttttc agagtttttg tggctctttt ccagacctgc cctgacctct 11520. agctctggga actatgtaag ccaagtgcct tccgggaagg gagtccctct cctggtaact ctttctgggt aaccagatgt ggactcatga cacacactga gcctacgtct tataattttt 11580 tgtttttgtt tttgagacag tttcggtctt cttgcccagg ctggagtgca atggtgcgat 11640 ctcggctcac tgcaacctct gcctcccagg ttcaagcgat tctcctgcct cagcctccct 11700 agtagctgga attgcaggca tgcgccacca cgcctggcta attttttgta tttttttt 11760 tttagtagaa acggggtttc accttgttag ccaggctggt caccaactcc tgacctcagg 11820 tgatccgccc acctctgcct cccaaagtgc tgggattaca ggtgtgagac agctgtgagc 11880 caccacgccc ggcgcatttt tttttcttt tttttcagag ggagtgtccc tctgtcaccc 11940 aggetgaagt gtagtggegt gateteggee eactgtaace tetateteee aggtteaagt 12000 gatteteetg acteageete ecaagtaget gggaetaeag gegeetgeta ecatgeetgg 12060 ctaatttttg tagttttagt agaaaccggg ttttgccatg ttggccaggc tggtctcaaa 12120 ctcttgactt caggtgatcc acctgccttg gccttctgaa gtgctgggat tatagggcat 12180 gagccactgt gactggccat cttaaatttt ttttttttt tttttttt ttgagacagg 12240 gtttcactct gtcgcccagg ctggagtgca aaggcgcgat cttggttcac tgcaagctcc 12300 geeteetggg tteatgeeat teteetgeet etgeeteatg agtaactgag actacaggeg 12360 cccaccacca cgcccggcta atttttttgt attttttag tagagatggg gtttcacctt 12420 gttagccagg atggtetega teteetgace tegtgateca eeegtetegg eeteecaaaa 12480 tgctggcatt acaggcgtga gccaccgcac ccagccttaa attttttt aagggaaatc 12540 aaacccagtg atattgggcc agtacagtgg ctcacacctg taattccacc actttgggag 12600 gctgaggcag gtgaatcacc tgaggtcagg agttcgagac cagcccggca aacatggcga 12660 aaccccgtct ctactaaaaa taagaaaatt agccgggcgt agtggcatgc acctgtaatc 12720 tcagctactc gggaagctga ggcatgagaa tcgcttgaac ctgggagcag gacgttgcag 12780 tgaaccgata tcacaccact gcactccagc ctgggtgaca gagcaagact ctgtctcaaa 12840 aaaaaaaaga aaaaaaaatc cagtgatact tactttttaa atttttattt acttatttt 12900 tgctttaagt tgaatcttta aacttatctt tatttttgag acacagtctc.actctgtcgc 12960 ccaggctgga gtgcagtggt acaaccacag ctcagtgcag cgttgacctc ctgggctcaa 13020 gccatcetce egecteagee tecegagtag etgggactae aggegeacae aaccatgtee 13080 agettatttt tgtatttttt gtagagacag ggteeeaetg tgttgeeetg gettgttetg 13140 13200 aacteetagg eteaagtgat eeceegeet eacceteeca aagtgetggg attacaggea tgagccacca catccagact tcacttttt gtttaatgtc gcaaatggca taaggaatgg 13260 gattcaatgg ggacacattt ataaacgttg cagcagctcc tagaacttgc ctatccttgt 13320 aaacttctct aggtgattgc taattacttc ttttttttt ttttttttg agacggagtc 13380 teactetgte geccaggetg gagtacagtg gegeaatete gteteactge aaactecace 13440 tecegggtte acgecattet cetgeeteag cetecegagt agetgggaet acaggeacee 13500 gccaccacgc ccggctaatt ttttgtattt ttttttagta gaggtggggt ttcactgtgt 13560 tatccaggat ggtcttgatc tcctgacctc gtgatccacc tgcctcagcc tcccaaagtg 13620

13680 ctgggattac aggcgtgagc caccatgccc agcccgctaa ttatttcaat ttgaccttga 13740 cactgagcct gccaagtagg ttcaagcatt ttgatggccc ctttacaggt tgggaaagct 13800 aatttatctg tccaaggccg aattctgaaa ctgagtctta actgccaaaa attcttatca 13860 tcaatttctt cttctgggtt gggcacagtg gctcatgcct gtaaagccag caatttgaga 13920 ggcatcatga tgcaagagga agaggattga gtgaagctag gagtttggga ccagcctggg 13980 caacatagtg agaccccatc tataaaaaaa aattaaaaat tagttgggca tggtggtgca 14040 ctcctgtggt cctagctatt caggaggctg aggtgggagg attccttgag cccagggttg 14100 acgctgcaga gagctgtgat cacgccactg cagtccagcc tgagtgacag ctggaaataa 14160 14220 tttccctgat taatcttttt ttttgtcctt ctgagagttc aatttgtccc ttttctgcct ggtctcctag gtttccctaa aatcctgctg agaggttagc actgcctgcc aaagtcagtt 14280 14340 tgcaaaatcc cagagaaatc cagcttattc ctgggggaac cgccaagact gcccagccct 14400 gtgtggggtt caggcaagtt tctcacatgt gcctttttgg caagaggcct ctggcaaccc 14460 catgagtccc caaagagact caattctaaa agttggtctc caccagctct ctgtggctta 14520 ggggttcaag ttcaactgtg aaagccctgt tttgttttga ttttgctttg agggagagga 14580 aaccgccctt ctgtttgttc aactccttct cctaagggga gaaatcaata tttacgtcca 14640 gactccaggt atccgtacaa ttgatttttc agatgtttat actcagccaa aggcgggatc 14700 ccacaaaaca aaaaatattt ttttggctgt acttttgtga agattttatt taaattcctg 14760 attgatcagt gtctattagg tgatttggaa taacaatgta aaaacaatat acaacgaaag 14820 gaagctaaaa atctatacac aattcctaga aaggaaaagg caaatataga aagtggcgga agttcccaac atttttagtg ttttcctttt gaggcagaga ggacaatggc attaggctat 14880 14940 tggaggatct tgaaaggctg ttgttatcct tctgtggaca acaacagcaa aatgttaaca 15000 gttaaacatc gagaaatttc aggaggatct ttcagaagat gcgtttccaa ttttgagggg 15060 gegteagete tteaceggag acceaaatac aacaaateaa gtegeetgee etggegaeae tttcgaagga ctggagtggg aatcagagct tcacgggtta aaaagccgat gtcacatcgg 15120 ccgttcgaaa ctcctcctct tgcagtgagg tgaagacatt tgaaaatcac cccactgcaa 15180 actcctcccc ctgctagaaa cctcacattg aaatgctgta aatgacgtgg gccccgagtg 15240 caatcgcggg aagccagggt ttccagctag gacacagcag gtcgtgatcc gggtcgggac 15300 15350 actgcctggc agaggctgcg agc atg ggg ccc tgg ggc tgg aaa ttg cgc met gly pro trp gly trp lys.leu arg -15-21 -20 tgg acc gtc gcc ttg ctc ctc gcc gcg gcg ggg act gca g gtaaggcttg 15400

trp thr val ala leu leu leu ala ala ala gly thr ala v 1 -5 -1

-10

ctccaggcgc cagaataggt tgagagggag cccccggggg gcccttggga atttatttt 15460 15520 ttgggtacaa ataatcactc catccctggg agacttgtgg ggtaatggca cggggtcctt 15580 cccaaacggc tggaggggc gctggagggg ggcgctgagg ggagcgcgag ggtcgggagg 15640 agtctgaggg atttaaggga aacggggcac cgctgtcccc caagtctcca cagggtgagg 15700 gaccgcatct tetttgagac ggagtetage tetgtegece aggatggagt geagtggeac 15760 gatctcagct cactgcaacc tccgcctccc gggtttaagc gagtctcctc tctcagcctc ccgaatagct gggattacag gcgcccaacc accacgcccg cctaattttt gtattttag 15820 tagagacggg ttttcaccat tttggccagg ctggtctcga accccgacct caggtgatct 15880

•		
gcccaaaagt gctgggatta caggcgtcag ccaccgcgcc cggccgggac cctctcttct	15940	•
aacteggage tgggtgtggg gaeetecagt eetaaaacaa gggateacte eeaceeege	16000	
cttaagteet tetgggggeg agggegaetg gagaeeegga tgteeageet ggaggteaee	16060	
gegggeteag gggteeegat eegetttgeg egaceeeagg gegeeaetge eateetgagt	16120	
tgggtgcagt cccgggattc cgccgcgtgc tccgggacgg gggccacccc ctcccgcccc	16180	
tgcccccgcc cctttggccc gcccccgaa ttccattggg tgtagtccaa caggccaccc	16240	
tegagecact eccettgtee aatgtgagge ggtggaggeg gaggegggeg tegggaggae	16300	
ggggcttgtg tacgagcggg gcggggctgg cgcggaagtc tgagcctcac cttgtccggg	16360	
gcgaggcgga tgcaggggag gcctggcgtt cctccgcggt tcctgtcaca aaggcgacga	16420	
caagtcccgg gtccccggag ccgcctccgc gacatacacg agtcgccctc cgttatcctg	16480	
ggccctcctg gcgaagtccc cggtttccgc tgtgctctgt ggcgacacct ccgtcccac	16540	
cttgtcctgg ggggcgccct cgccccacca gccccgatca agttcacaga ggggcccccg	16600	
gccaccctca aggcctcggt tccttacgag gttgaaacgt tgcctcagaa tctccccgcc	16660	·····
cctccttggt ctgcagccga gatcttcagc cacggtgggg cagctatccc ccgggaccga	16720	•••••
ccccctgggg tggcctcgct tcttcagagg ctgtgaatgg cttcggttca gctgtccaag	16780	• •
cggcgatttt tcctctgggt gaaatggatt agattttaga tttccacaag aggctggtta	16840	
gtgcatgatc ctgagttaga gctttttagg tggctttaaa ttagttgcag agagacagcc	16900	•••••
togocotaga caacagotac atggocottt cootootgag aaccagoota gootagaaaa	16960	····
ggattgggat tgcctgatga acacaaggat tgcaggaaac ttttttttta attggcaagg	17020	-
gggttggctt tgactggatg gagagetttg aactgeettg aaatteaege tgtaactaae	17080	:. ·.
acaccagttt cctctgggag gccagagagg gagggagggt gtaatgaaat acggatgatt	17140	
gttcttttat ttttatttac ttatttattt tttaactttt tgtagagatg aggtctcgct	17200	::
tggttgctca ggctggtctt gaactcctgg cctcaagcga tcctcctacc tcagcctccc	17260	:
aaagtgttgg gattacagga gtgagccacc gcgccccacc ggggatgatg atgattgcaa	17320	: . :
acattctgcc actcagtttt acaaaagaaa gagaggcact ggattaatgt gtatctcact	17380	****
caccaatcaa cctcttcctt aagagaaaat gttaaggaag tcttaggcaa ggccttgttt	17440	
gttcatcact ttagtttctc tctcccggga tggctgagaa tgtgatgttt cctctgttgt	17500	·
caaggagact acacccctga tgttttcctc cagacttctg agagctggtg tgtgtttcta	17560	
gcactttcta gctgcaccac ctcacgctgt agctggcttc aaggcatatc caggggggag	17620	•••••
tttcttgtcc atttccttta caaagggaag ttgttggaat ctgaaccgca agccttcact	·17680	•••••
tagaccaaaa tcaggcaaca gcggtgagcg cagctccaaa cgtgtcaatg actcacccaa	17740	••••
atttgagtaa gggagttggc tgctttaacg agccgcaggg tgattccctt gtcatttccg	17800	
gaaataccta tettecaggg aacaetggga aaaaacaggg agaeetttgt tgagacagaa	17860	
aacctgtagg ggaattetgt teeteattee tgetettate tgtagaette etecetgata	17920	
agatecaatt ctagatgggt eggttgetee ttgetttgat gggtgetttg atgggettta	17980	
ttattattat tattattatt attattattt tgatgggctt tttgatgtcc cttttccttc	18040	
cacactetgt eccaactgte aageaaatag cettttgttg etaagagaet geagatgtaa	18100	
ccgaccagca gcaaacagtg agtcaggctc tctcttccgg aagcaaaatc aattgctgag	18160	
atcactctgg ggaaaatacc caccttattt ggaaagaagc actgatcaat tgatgtctat	18220	
ttttttttt tttgagttgg agtctcgccc tgtcacccag gctggagtgc aatggcataa	18280	
totogootea otgoaateee egectooogg gttocageaa ttotootgoo teagectoot	18340	
gagtagetgg aattatagge geetgeeaca acaccegget åatttttgta tttgtagtag	18400	

18460 agatggggtt tcaccacgtt ggccaggctg gtctcgaact cctgacctcg tgatccaccc 18520 gcctcagcct cccaaagtcc aaggattgca ggcgtgaccc actgtgccag ccaatcaatt gatttctcat tcattttcag ctggctctgt tcccttaagc caggggattt tcgtttgttt 18580 18640 gtttcccctt caaggaaatg attctagcta cagttttgat ttccttgtac aactgttttc 18700 agtagcacag ggaaagaaaa catcgaaagc attcaccacc tcatttgtgt gctgggggaa 18760 aaagcagaaa tgtgtattct ctttttttgt ttcgatgacc ttgttcctga cttgttactc 18820 gtgacttgag agatcagagg gctagaggac tagaatttat agaggtgttt tttttgtttg 18880 tttatttttg ttcgagttgc ccaggctgga gtgcagtggc gcaatctcgg ctcactgcaa 18940 cctctgcctc ccaggttcaa gcgattcttc ggcctcagcc tcctgagtag ctggaactac 19000 aggegeege caccacacce agetaatttt tgtattttte agtagagatg ggattteace 19060 atattggtca agetggcctc gaactcctga cctcgtgatc cacccgcctc agtttcccaa 19120 agtgctggga gtacaggcgt gagccgccgt gcccggcctt tttgtgttttt tgtgtttttg 19180 agaggagete attgettttt aggetteeet agegtgagaa aatetgggga tecatgetet 19240 agtttacttc ctttttttt tttttttga gatggagtct cgcttagatt gcctaatctc 19300 ageteattge aacttetgee teeggggtte aagggattet egtgteteag eeteetgggt 19360 agctaggata cgggcacccg ctaccatgcc tggctaattt tgtactttta gtagagacag 19420 ggtttcgcca cgttggccag gctggtctcg aactcctgac ctcaggtgag ccgcctgcct 19480 tggcctccca aagtgctgag attacaggcg tgagccaccg cgcttggcct aatttgcttt 19540 tcctgaaatt caaatggtct aatatgaaaa acgccaacct tgcttgaaag aataagaaag 19600 aggtgcggtt tcgttgggcc gttgatgttt ggaacaggac tggttttgtc cccttgctcg gaaagggcag caactgtgag gacagctccc tgacgtgctc tcactcagca ctgttccgtt 19660 19720 cctgagcact gtccccacta gctaggccaa gggagctcat ttggcaggca actgctgtct 19780 ggctgcgcct gtggcagtaa aatctgcctt tattttttgg aggcagggtc ttgccctgtc 18940 gctcaggctg aagtgtgcag ttatagctca ctgcagcctc cagcttctgt actcaactga 19900 tcctcctctc tcagcctcct gagtagctgg gactatacgc acgtgttacc actcccacct 19960 cagtttgttt gtttatttat ttatttattt atttattgag atggagtttt gctcttgctg 20020 cccaggctgg agtgcaatgg cgcgatctcg gctcaccgca acctccacct cctggttcaa 20080 gcgattctcc tgcctcagcc tcctgagtag ctgggattac aggcatgcac caccacgccc 20140 ggctaatttt gtatttttcg tagagatggg gtttctccac attggttcag gctgttctcg 20190 aacteccaac etcaggtgat ecaceegeet eageeteeca aagtgetggg attataggeg 20260 tgagcccccg aacccggcca ctcccagcta agtttaaatt ttttgtttgt ttgttcgttt 20320 gtttttattt tttgagacag agtctcccgc ccaggctgga gcgcagatca ctgcatcctt 20380 gacctcccag gcttaagcca tcctccccac tcagcctccc aagtagctgg gattacaggt 20440 gtgtgccact atgcttggct aagttgtgta ttttttgtag agatggggtt caagggattc 20500 tegetttgtt geeteggttg gteteaaaet eetgggetea ageagteete eeteeteage 20560 ctcccaaggt gctggggaaa tccacttttg aaacattgtc tggagagttg cccaggtggt 20620 agatcacaga aataggtcat cgtggggtcc ttcccatggg tgcagtcttg agccacctgt ggccagcaaa tatttggaga ataatagtca ggggagagct tgaggtccag ggaaaggttt 20680 20740 tgtttttctt cagggaaagg tttttattgt tctttatccc tccttaaagg accttcaggt 20800 gttactgaca ttcccggtct acccagtggc acatttagtt tgtaagctgg gccctcgtac agaggtaggg aggtgagagc attggattag tggtcaccaa agctgcggtc acctagtggg 20860 20920 gtgatcagag gctcctccct taagatcttg attgccaacg cctctggccc aactttcctt

tttatttatc gcaagcctcc tggaatctca attgcttttt gcccacccgg tgtgtcagca 20980 21040 caagaaatga gtcatttcct cctttaagca cagttgaaat tgagctgtga gtcagtgagg 21100 tgtgtacgat attgtcaaag cggggtgtgt acagtattga cagatctgta gttgggcaag agaattatca gagtttgtga ccacagcaga ttccaaagct cgactcattt tcttctctct 21160 teetteeett ttttettte tttttttt ttttttgae agagtetege tetgttgeee 21220 21280 aggetggagt gcagtggcac aatctgggct cactgcagcc cctgcctcct gggttcaaat gatteteatg ttteageete eegagtaget geaattacag geattegggt teaagtgatt 21340 ctcctgcctc agccacctga gcagctggga ttacaggcgc ccgccaccac gcccggctaa 21400 21460 tttttgtatt tttagtagag acggggtttc accatgttgg ccaggctggt ctcgaactcc 21520 tgaactcagg tgatccgccc acttcggcct cccaaagtgc tgagattaca gacgtgagtc accgcgccca gcctgttctg ttctttaatt ctcaaaacac cctctaggaa gtagagactg 21580 ccattctccc ccattttaca gatcaggaaa ctgagtccca gaaggattta gtcagttacc 21640 caagttgttc tagttaaatg gcctggaaag ccagtgaagc ccaggattgt ctatctaacc 21700 cccttactac totaactttc agggaatcca catgaatgtg ctgggtcaac catcaaagtt 21760 gaaatggata aagggggctg gatgcggtgg ctgatgcctg taatcctagc actttgggag 21820 gccgagatgg gtgggtggat tgcttgagcc caagagtttg agaccagcct gggcaacata 21880 21940 gtgagacacc tgtctctgca aaaaataaat aaaaagttag ctgagtgtga tggtgcaccc ctctagtcac agctgttgag ttaggcttag gcaggaggat cgcatgaacc tgggaggtgg 22000 22060 aggeggeegt gagecteagt catgeenetg cactecaace tgggcaacag agtgaaagce 22120 ggtgtccgaa agagaaagaa aaaaagacat agatacatct tttaaagtta ggttgtatgt 22180 taattaccta caactcagtt tcaactgtgc ttaaaggagg aaatgactca tttcttgcta 22240 catatcaaat tagcccaaaa tgtagtggct taaaacaaca catttatgat ttctcagttt 22300 ttgcgtgtca ggaatttgga agcagcacag ctagacggtt ccagctcagg gtctctcatg 22360 aagttgcaat caaaatattg gcaggagaga aaaacatatt ttcagaagct gcaggcatag 22420 gaagacttgg ctggggttga aggatecact tecaagatgg cgcactcagt ggctcttggc 22480 tggaggcctc agttccctgc tgcgtggagc tctccctcca gctgcttgag tggactcatg 22540 acatgcagct ggcctcccct ggagcagtcg atccaacaat gagcatggcc atgaactagg 22600 ctcagaagcc actccctgtc gtctctacat tttcctatca gaagcaagtc attaaaagtc 22660 cagtgccact ccaggggaga cgaattaggc tctgccttct gaaaggatta tcacagaaga 22700 tgcggtccta tattcttttt ttaaaattat tcttttttt attttgtaga gatggggtct 22780 tggtatgttg cctaggccag tctggaattc ctgggctcaa acaatcctgt ctctgcctcc 22840 caaagtgttg ggattacagg catgagccac tgcacctggt catgtggtca tattttcttt 22900 ttcttttttt ttttttttg agacagagtc tctgtcgccc aggctggagt atggtggcgt 22960 gateteagtt caetgeagee tecgeetece gggtteaage gatteteetg ceteageete 23020 ctgagtagct gggattacag gcgcccgcca acatgcccag ctaatttttt tagtagagat 23080 ggggtttcac catgttagcc aggatggtct cgatctcctg atttggtgat ccgcccacct 23140 tggcctccca aagtttcaac catcgatcag aacttattga tgtacttatg tagctaggca 23200 cggtggcgcg tgcctgtaat cccagctact tggaagggtt aaggcaggag aatcgcttga 23260 acctgggagg cagaggttac agtgagtcaa gatcatacca ttgcactcca gtctgggcaa 23320 cagaatgaga ctctgtctca aaaacaaaaa acaaaccctt gtatgtgatt ttcctggata 23380 gcatctgtta catcttcaca aagataaaaa gtcagacttg gctgggcatg gtggctcaca 23440 cctgtaatcc cagcactgag aggctgaggc aggcagatca cttgaggtca ggaatttgag

23500 accaggetgg geageatggt gaaaccccgt ctctacaaaa aatacaaaaa ttagccgggt 23560 gtggtgtcac gcacctgtat tcccaagcta ctcaggaagc taaggcagga gaatcacttg aacccagagg tggaggtttg cagtgagttg agattgtgcc attgcactcc agcctgggcg 23620 23680 23740 tttttcttct tggtattgtt accttattat agtaataata agtgcatagt gcatgctgag 23800 ataagcaatc ataatttgtt attgcggccg ggcatggtgg ctccagccta taatcccagc actttggtca ggagttcaag gccagcctgg ccaatatagt gaaactccat ctctactaaa 23860 23920 atacaagaaa ttacctgggc atggtggcag ttgctggtga tccccagcta cttgggaggc 23980 tgaggcagga gaatcgcttg aacctgggaa gcagaggttg cagtgagcca agattgcacc 24040 actgcactcc agcctgggtg acagagtgag actctgtctg aaaataataa taataataat ttgttattgc ttttattgcc ttagtttaca tagggaatca aagtttatac tttgatttat 24100 aaaagttgct ttgattctag ttcacagaac cagaatcttt catataaagg tattagaggg 24160 24220 cccagtgtgg tggctcatgc ctgtaatccc agcatattgg gaggctgagg agggaggatc actttaggag tttgaggcca gcctaggcaa catagtgaga ccttgtctct acaaaaaatt 24280 ccaacattag ctgggcatgg tggcatgtgc ctgtagtccc atttatttgg ggggctgagg 24340 24400 caggaggate acttgageee acgaggttea atceaggttg cagtaageea tgateetgee 24460 actgcactcc agtttgggta acagagcgaa gctatgtctc aaaaaaagaa aaaaaaagta 24520 ttctaaatcc aaatttaata tataaaacta aatgcaggcc aagtgtggtg gcatatacct 24580 ataatcacaa cactttggga ggctgaggtg ggaggattgc ttgagcccaa gagttcaaga 24640 ccagcctagg taacacagta agaccccatc tctacaaaaa gtagaaaaat tagcctggca tggtggtgag tgcttttaat cccaactact tagggggctg agatgggaag attgcttgag 24700 24760 cctcagagtt tgaggctgca gtgggccgtg atcgctccac tgatcgctct aaagtgagac 24820 cctgtctcaa aaaaaaagaa aatagaagaa aactaaatac attcaataag actttgatct 24880 cttttccaag gtgtaaatat attttgggaa attttccagt tactttgttc tcattttaat 24940 gtaataatct aagtcttggt tttctaagga aaagttttct cttattatat cttttgttaa 25000 tgtttctctc ccatttcttt tgatctgatc ttcagataca tgattatctt cactgctaaa 25060 tttgtgttct ctggcctcta catttataat ttctcataat tctttatcta agtatttctt ccctacctac tgaagaaaac tcaagttttc ttccacctta atgattatgc tgtgtctgtg 25120 25180 agttttcttc atgactcttt acagtacaag ttttttgttt ttgtttttt aatggtcaga 25240 tggatagaac aacacaggtt ttgtttgttt tgttttaact tttaaaaaaa.ttataataga 25300 taaagggtct cactacgttg tccaggctga tctcatactc ctgggctcaa gcaatccacc 25360 cacctctgcc tcccaaagtg ctgggattac agtcatgagc caacatgcct gggcagtaca 25420 ggtttttttt gagacggagt tttgttcttg ttgccgaggc tggagtgcaa tggcacaatc 25480 ttggctcacc acaaagtctg cctcccaggt tcaagtgatt ctcctgcctc agcctcctga 25540 gtagctggga ttacaggcat gtgccaccac gcccagctaa ttttgtattt ttagtagaga 25600 cggggtttca ccatgttggc caggctggtt tcgaactgct gacctcaggt gatctgccca 25660 cctcggcctc ccaaagtgct gggattacag gcatgagcca ccatgcccag ctgtagtaca 25720 ggttttaata tgctaaatac tcttcctttc tttattaatg tgcatggaag ttctaatatt 25780 tttttcccat accccagaga gtccatattt tggaatcaac aacactagcc tttgttgaca 25840 agtgtctctc ttgggttcct tctttgtgtc ctccactgaa ttttggggtt cataaaattt 25900 catttgttgt gcttgcttaa ttccctggga atcagactgt tcctgatcgg atgacatttc 25960 tggttaattc tttagttggc aggaaataga cacaggaaac gtggtcagtt tctgattctg

ž

gcgttgagag accetttete etttteetet eteteag tig gge gae aga tig gen al gly asp arg cys glu 5	26014
aga and gag the cag tge caa gae ggg aaa tge ate tee tab any and	26062
arg asn glu phe gln cys gln asp gly lys cys ile ser tyl lys cip	
10 15	26110
gto too gat ggc age get gag tge cag gat ggc tet gat gag tee cag	20110
val cys asp gly ser ala glu cys gln asp gly ser asp glu ser gin	•
25 30 ³⁵	26160
gag acg tgc t gtgagtcccc tttgggcatg atatgcattt atttttgtaa	
glu thr cys l	
40	26220
tagagacagg gtctcgccat gttggccagg ctggtcttga atttctggtc tcaagtgatc	26280
cgctggcctc ggcctcccaa agtgctggga ttacaggcac cacgcctggc ctgtgacacg	26340
attettaace cettitigat gatggegget ggaaaagtgg ceagtggatt tigatgtatt	26400
caatcatgaa ttaggaggtg gggagagaat gaattattgg agctttcctt aaagccatta	26460
aatggctcta ttgtttttc aattgatgtg aatttcacat aacatgaaat taaccagctc	26520
agtggcatta atacatctgc aatgctgtgt ggccaccacc tctatcttgt tccaaaactt	26580
tgcataacct aatgtctttt ttttttttt tttttgagac ggagtctcgt tccatcaccc	26640
aggetggagt geagtggtgt gateteaget eactgeaace teegeeteec aggtteaege	26700
catcetectg cetcageete cegagtaget gggactacag geacceteca ecacateegg ctaattttt gtatetttag tagagatggg gttteaccat gttageeggg atggtetega	26760
tetectgace tegtgateca cetgeeteeg ceteceaaag tgetggeatt acaggegtga	26820
gccaccatgc ccggcctatt ttttttttta agagatggag tctaattctg ttgcccaggc	26880
tggagtccag tggtaccatc atacttcact gcagccttga cctcttgggc tcaagtgatt	26940
ctcttgcctc gaactcccaa agtattggga ttacaggtgt gagccaccgc actcagccta	27000
atgtccagtt tttaacaagc tccatttaaa tgccctccgt tttgacccat aaaggggtag	27060
gcttggccgg gcacaatggc ttgtgtctgt agtcccagct acttgggagg ctgaggcaga	27120
aaggcagaaa gattgcttta taaagcccag gagtttgagg gccacctggg tggcatagct	27180
agacctcatc tctaaaaaat aagtaataaa taaatatttg tttttgtttt tttcttttc	27240
tttctttt tttttttt tgagacggag tcttgctctg ttgcccaggc tggagtgcag	27300
tggcgcgatc tcagctcact gcaagctgtg cctcctgggt tcatgccatt ctcctgcctc	27360
agcetecega gtagetggga ctacaggege ceactaceae geecagetaa ttttttgtat	27420
ttttagtaga gatggggttt caccacgtta gccaggatgg tctcaatctc ctgacctcgt	27480
gatecgecag etttageete ecaaagtgtt gggattacag gegtgageea etgageeage	27540
cocatatota totatatata tattitita aaatgggaga ccaggcatgg tggctcutge	
ctagaatoog aggastttag gaagetgagg taggeggate acttgaggee atgagetaga	7
gaccagootg of caacatga tgaaacttot atototacta aaaaaaaag tgggattagg	
toaggoagg togetcacac ctgtaatccc agcactttca gaggecgagg caggaggar	
atgaggt cag gagat cgaga ccatcctggc taacacggtg aaaccccgtc tetto	
aaatacaaaa aattagccag gcgtggtggc gggtgcctgt agtcccagct actcaggagg	27900

	•
ctgaggcagg agaatggcgt gaacccggga ggcggagctt gcagtgagcc aagatcgtgc	27960
cactgtactc cagcctgggc gacagagcaa gactctgtct caaaaaaaaa aaaaaaagtg	28020
ggattgacat tetetteaaa gttetggggt ttteetttge aaagacagga ttggeaagge	28080
cagtgggtct tttttgtgtg tgtgtgtgtg acggagtctc actctgccac ccaggctgga	28140
gtgcaatggc aggatetegg eteacegeaa ectecteete ecaggttaaa gtgattetee	28200
tgcctcagcc tcccgagtag ctgggactac aggtgcccgc caccacaccc aactaatttt	28210
tgtattttta gtagagacag ggtttcacta tattggccag gctggtcttg aacccctgac	28320
ctcacgtgat ccacccgcct tggcctccca aagtgctggg attacaggcg tgagccactg	28380
tgctcggcct cagtgggtct ttcctttgag tgacagttca atcctgtctc ttctgtag tg	28440
eu	
tot gtc acc tgc aaa toc ggg gac ttc agc tgt ggg ggc cgt gtc aac	28488
ser val thr cys lys ser gly asp phe ser cys gly gly arg val asn	
45 50 <u>55</u>	
cgc tgc att cct cag ttc tgg agg tgc gat ggc caa gtg gac tgc gac	28536
arg cys ile pro gln phe trp arg cys asp gly gln val asp cys asp	
60 65 70 75	
aac ggc tca gac gag caa ggc tgt c gtaagtgtgg ccctgccttt	28581
asn gly ser asp glu gln gly cys p	
80	
gctattgagc ctatctgagt cctggggagt ggtctgactt tgtctctacg gggtcctgct	28641
cgagctgcaa ggcagctgcc ccgaactggg ctccatctct tggggggctca taccaagcct	28701
cttccgccct tcaaatcccc ccttgaccag gaggcattac aaagtgggga tggtgctacc	28761
tettegggtt tgtcacgcac agtcagggag getgtceetg eegagggeta gecacetgge	28821
acacacactg gcaageeget gtgatteeeg etggtegtga teeeegtgat eetgtgatee	28881
ccgccccgtg aggctgaaca catagtgacg cttgctagcc aagcctcaat gacccacgta	28941
acatgaaggg ggaaaagcca gaaagttctg ccaaggagca aggccaagaa tcccgaaggg	29001
aaatggactt tgaagctggg cgtcttcttg gctgtcttaa tacaagtggc acatccaaat	29061
ccaaaacccc gaaattcaaa gtcttgagca cccgaaattc tgaaacgtct tgagcactga	29121
cctttagaag gaaatgctta ttggagcatt ttggatttcg gatttttacc actgagtgtg	29181
gagtectaat taggaaaaaa accaggetga eegaaccaaa ggaaageaat aaaagaagge	29241
agatagggtc aggcacggtg gctcacccct gtaatcccag ccttttgaga ggctgaggcg	29301
ggtggatcac ttgaggtcag gagttcgaga gcagcctggc caacacggtg aaaccccatc	29361
tctactgaaa atacaaaaac tagccaggta tggtggcgtc tgcctgtaat cccagctact	29421
cgggaggctg agacaggaga atcacttgaa cctgggaggc agaggttgca gtgagccaat	29481
atcacgccat tgcactccag cctgggggac aagagcgaaa ttctgtctca aaaaaaaaga	29541
agaagaaggc cgacaaacta tgtaactctg cctttctcca tggtccagaa cacacagccc	29601
tcctgcgtaa ataactcctt atcttcctgc tcccagctat catcagacac ctcggctgat	29661
agaaaattgc aagttagete actgcaacet eggcattata agtactgcae aaagecetet	29721
tcagcgcaca gcacaagcac cattetataa aatetecage aageggeeag gtgcagtgge	29781
tcatacctgt aatcccagca ttttgggaga ctgaggcggg cggatcacct gaggtcagga	29841
gtttgagacc agcctggcca acatggtgaa accccgtctc tattaaaaat acaaaaaaat	29901
tagccaggcg tggtggcagg tgcctgtaat cccagctact tggaaggctg aggcaggaga	29961

7.7	
atcgcttgaa cccgggaggt ggaagttgca gtgagccgag atcttgccat cgcactccag	30021
atcgcttgaa cccgggaggt ggaagttyca gegagoes aaaaaaattcc cagcaagcct	30081
cctgggggac aagagtgaga cttcgtctca aaaaaaaaaa	30141 .
ttgtcttctg gcagtcagct cctctcttgc tgacctgctc attgctttct tgcaaggtat	30201
tttcctacct actttctgga ataaatctgt ctttctgtac ttacaactac cttttttaaa	30261
attettet tittgagat ggagteteae tetgtitgee eaggetggag tieagtggtg	30321
caatctcage teactgcaae etctacetae tgggttcaag egatteteet geetcagett	30381
cccgagtage tgggattaca ggcgtgcace agcacgcagg ctaatttttg tatttttagt	30441
and an argan throaccatg traggeragg traggerage traggerage creating and traggerage tragger	30501
baconcetes acctecesas acactagat tacggecatg agecactgag geoggetyes	30561
The constant tottgataga ttcttacccc cacaccactg gtccayatag todgaga	30621
and an east transport at coasatttga ascattcoas astcayasas attata	30681
totagents thecasaate caaaaaaatt caaaatecaa aacaetteeg geeedagee	30741
bethagagaa gggatactca acccaaaata aggacagcaa ttctataaat tgtgotaoo	30801
between the carettan carettaca cotattageg caccagiget catagody	•
the entropy of the canal gardaactga ggcaccgaga gggcagtggt toagagees	•••••
the state of a charteres acceptett ceagggeet ggettatig tygetay	•••••
and the state of t	30981
treatacts can co coc and acd too cad gac gay tot ego the	31029
ro pro lys thr cys ser gln asp glu phe arg cys	••••
85. 90	
and gag and tag atc tot egg cag tto gto tgt gac toa gac egg	31077
his asp gly lys cys ile ser arg gln phe val cys asp ser asp arg	
100 105	••••
gac tgc ttg gac ggc tca gac gag gcc tcc tgc ccg gtg ctc acc tgt	31125
asp cys leu asp gly ser asp glu ala ser cys pro val leu thr cys	3
	• • •
ggt ccc gcc agc ttc cag tgc aac agc tcc acc tgc atc ccc cag ctc	g 31173
gly pro ala ser phe gln cys asn ser ser thr cys ile pro gln let	a
135	•
tgg gec tgc gac aac gac ccc gac tgc gaa gat ggc tcg gat gag tgc	g 31221
trp ala cys asp asn asp pro asp cys glu asp gly ser asp glu tr	P
1 E A 133	
ccg cag cgc tgt agg ggt ctt tac gtg ttc caa ggg gac agt agc cc	c 31269
ccg cag cgc tgt agg ggt cct tac gcg too and sys of pro gln arg cys arg gly leu tyr val phe gln gly asp ser ser pr	o
	5
160	c 31317
tgc tcg gcc ttc gag ttc cac tgc cta agt ggc gag tgc atc cac tc	r
cys ser ala phe glu phe his cys leu ser gly glu cys ile his se	
	ag 31365
age tgg ege tgt gat ggt gge eee gae tge aag gae aaa tet gae ga	Lu
ser trp arg cys asp gly gly pro asp cys lys asp lys ser asp gl	
195	
·	

		•
gaa aac tgc g gtatgggcgg ggccagggtg ggggcggggc	31415	
glu asn cys a		
210		
ctgtccctgg gctcccccag gtgtgggaca tgcagtgatt taggtgccga agtggatttc	31475	
caacaacatg ccaagaaagt attcccattt catgtttgtt tcttttttt ctttcttc	31535	
tttattttgt ttttgagatg gagtctcact ctgtgatttt tttcatctct aaatttccta	31595	
catccatatg gccaccatga ggccccaggc tggccgatgg ttgctgttag cttattggga	31655	
aatcactgtt tggaaggtgc tggttgtttt ttgttgtttg ttgtttttgt ttttgttttt	31715	
gttttgagac ggagtctcgc tctgtcgcca gggtggagtg cagtggcgcg atcagctcac	31775	
tgcaacctcc gcttcctggg ttcaagccat tctcctgcct cagcctccca agtagcgcgg	31835	
attacaggca tgtgccacca cctccggcta ttttttttc tatttagtag agatggggtt	31895	
tcaccatgtt agtcaggctg gtcatgaact cttgacctca ggtgatccac ccgcctcggc	31955	•••••
ctcccaaagt gctgggatta caggcgtgca ctgctgcacc cagccttttt ttgtttttt	32015	• • • • •
ctcccaaagt gctgggatta caggcgtgca ctgccgctgca cagattatg gctcactgcg	32075	
gagacagggt cttgctgtca cccaggttga agtaaggtgg cacgattatg gctcactgcg	32135	
geettgatet cettggetea agegateete teaetteage eteteaagea gttggaacea	32195	••••
caggotgtac caccaagcot ggccaatttt tttgtacaga cacaggotgg tottgaacto	32255	••••
ctgggctcaa gcaatcctcc tgccttggcc tcccaaagtg ctgggattcc aggcatgagc	32315	
cgctgcaccc ggcaaaaggc cctgcttctt tttctctggt tgtctcttct tgagaaaatc	32365	
aacacactct gtcctgtttt ccag ct gtg gcc acc tgt cgc cct gac gaa		
la val ala thr cys arg pro asp glu 215		
	32413	
tte cag tge tet gat gga aac tge ate cat gge age egg cag tgt gae		: .
phe gln cys ser asp gly asn cys ile his gly ser arg gln cys asp		•• •
220 225 230		••••
cgg gaa tat gac tgc aag gac atg agc gat gaa gtt ggc tgc gtt aat		****
arg glu tyr asp cys lys asp met ser asp glu val gly cys val asn	•	
240 243	32512	
g gtgagcgctg gccatctggt tttccatccc ccattctctg tgccttgctg	320==	••••
V	32572	:
cttgcaaatg atttgtgaag ccagagggcg cttccctggt cagctctgca ccagctgtgc		
gtctgtgggc aagtgacttg acttctcaga gcctcacttc cttttgtttt gagacggagt		•
ctcgctctga cacccaggct ggagtgctgt ggcacaatca cagctcacgg cagcctctgo		
ctetgatgte cagtgattet cetgeeteag ceteeegagt agetgagatt aaaggegtat		
accaccacge ceggetaatt ttttgtattt ttattagaga cagggtttet ceatgttgge		
caggetggte ttgaacteet ggteteaggt gatecaceeg eeteggeete eeaaagtge	32812	
aggattacag gtgtgagcca ctgcgccagg cctaattttt ttgtattttt agtagagatg	g 32932	
cggttttgcc atattgccca ggctggtctc gaactcctgg gctcaagcga tctgcctgc	5 32332	
tragectoce agagtactag gattacagge acaaaceace gtgeeegaeg egittiett	a 33032	
atgaatggat ttgcatgggt tcttatgtga ataaactatt atatgaatga gtgccaagg	a 33112	
aactgagget cagacacace tgacetteet cetteetete tetggetete acag tg a	ca 332/1	
al t	hr	

te tge gag gga eee aae aag tte aag tgt eae age gge gaa tge ate 33219)
eu cys glu gly pro asn lys phe lys cys his ser gly glu cys ile	
255 260 265	
cc ctg gac aaa gtc tgc aac atg gct aga gac tgc cgg gac tgg tca 33267	7
hr leu asp lys val cys asn met ala arg asp cys arg asp trp ser	
70 275 280 285	
at gaa ccc atc aaa gag tgc g gtgagtctcg gtgcaggcgg cttgcagagt 33319	9
sp glu pro ile lys glu cys g	
290	
tgtggggag ccaggaaagg gactgagaca tgagtgctgt agggttttgg gaactccact 3337	9 .
traccacce totacaaaga geteettttt teattttgag acagtetege acagtegeee 3343	
aggetggage geaatggege gatettgget caccacaace teeggeteec aggtteaage 3349	9 ::
gattettetg ceteageete etgagtaget gggattacag etgaatgeea cettgetggg 3355	9
ctaatttttg tatttttagt agagatgggg tttcaccatg ttggccaggc tggcctcgaa 3361	9
etcetgacet egagtgatet gecegeetee tgaagtgetg ggattacagg egtgageeac 3367	9
etcgtcctgg tgagggtttt ttttttccc caaccctctg tggtggatac tgaaagacca 3373	9
rattaggata actgtacagt atagagaagg cagtggcaag ttttctctgt catataccag 3379	:••••
actagaetta ageatagtag catactectg tagteteage taateaggag getgaggaag 3305	
gaggateget tgggeecagg agttggagae tgtagtgage tgtgateaea ceaecacaet 3391	.9
tcaatctggg caacagagca agagacccta tctctaaaaa aaagtaagta tttcggacac 3397	9
tgtgggccat acggtctctg gtgcagtttc tcaacatggc tgttgggtga acacaaccac 3403	19
gcacagaacg caaaccaata cacgtggctg tgggcccaga aaatgttatt tatggacaca 3409	9
aaaattggaa tttcatataa ctgttttgtg tcatgaaaat gatttccctt tttatttta 3415	i9 ·
tttttcttct caagtattta aatatgtaaa agccattttt aggcctggca ggatggttca 3421	٠٠٠٠
cagctgtaat cccagcactt tgggaggtcg aggcgggagg atcacgaggt caggagatcg 3427	19
agaccatect ggecaacaca gtgaaacece gtetetacta aaaatacaaa aaattaacca 3433	39
ggettggtgg egegegtetg tagteceage tgeteaggag getgaggeag gagaateget 3439	99
tgaatgcagg aggcggaggt tgtagtgagc cgaggttgca ccactgcact ccagcctgag 3445	59
cgacagagtg agagtccgcc tcaaacaaaa aaatgtttgc ccatgctggt cttgaactcc 3451	19
tgggetcaag ctatetgeet geettggtet eccaaagtte tgggattaca ggeatgaget 345	79:
acagegeeg gaettttgtt gttttatate tatatateta tatataaett gttttatgta 346	39
tatatataac ttgttttata tatatacata aactgcagta aaaaacatgt aacataaaat 346	99
ttaccttctc aaaccttatt aagtgcacag ttctgtgcca ttagcaaatt cacactgttg	59 ·
tacaacatca caaccaccat ctccagaact ttttttttt tttttattct ttttgagaca 348	19 .
gagtctcact cgtcgcacgg gctggagtgc agtggtgcga tctcggttca ctgcaacctc 348	79
cacctaccag gttcaagcaa ttctcctgcc tcagccccct cagtagctgg gattacaggt	39
gcccgtccta ccacgcccag ctaatttttg tattttcagt agagactgac tgggtttcac 349	99
catgttggcc aggctggtct cgaactcctg acctcaagtg atcctcccac ctcagcctcc 350	59
calagrants great acagg catgagecae tgegeeegge eecagaacte ttttatette 331	
ccaaactgaa gctctgtccc catgaaacac tcactctcca tccctcccc aactcctggc 351	79
acceaceatt ctactttctg teectatgaa tgtgatgget ctagggacet cetetgagtg 352	39
gaatcagaca gcattttcct tttttgactg gcttatttca ctgagccaag tgcggtggca 352	99
gaarcayata gtatteesee	

cacgcctgta atcccaaaac tttgggagac cgaggcgggc gcatcaccag aggacaggag	35359	
nncgagacca gcccggccaa cagggggaaa ccccatcact agggagcctg cagaaagaaa	35419	
gccaccacat ggcctgctgg agccacacaa tcccagcaaa acagggacgc taaacgtagg	35479	
agaaacacac aaccccagga ggcggaggtc gcagtgagcc gagatcgtgc cattacactc	35539	
cagcetgggc aacaagagtg aaacteegte teteetaaaa atacaaaaaa attagetggg	35599	
catggtggca catgcctgta gtcccagcta cttgggaggc tgaggcagga gaatcacttg	35659	
aacccgggag gtggaggttg taatgagcca aggttggcgg cgaagggatg ggtagggcc	35719	
cgagagtgac cagtctgcat cccctggccc tgcgcag gg acc aac gaa tgc ttg	35773	
ly thr asn glu cys leu	•	
. 295		
gac aac aac ggc ggc tgt tcc cac gtc tgc aat gac ctt aag atc ggc	35821	
asp asn asn gly gly cys ser his val cys asn asp leu lys ile gly		•••
24.0		
	35869	
tac gag tgc ctg tgc ccc gac ggc ttc cag ctg gtg gcc cag cga aga	30,00	
tyr glu cys leu cys pro asp gly phe gln leu val ala gln arg arg 315 320 325 330		•••
320	35926	:
tgc gaa g gtgatttccg ggtgggactg agccctgggc cccctctgcg cttcctgaca	33720	•
cys glu a	35986	
tggcaaccaa accectcatg ceteagttte eccatetgtt aagtgtgett gaaageagtt		•
aggagggttt catgagattc cacctgcatg gaaaactatc attggctggc cagagtttct	36046	7
tgcctctggg gattagtaat taagaaattt caggccgggt gcgtaatccc tgtaatccca	36106	
acacettggg acgeegagge gggeagatea eetgaggteg ggagtteeag accageetga	36166	
ccaacatgga gaaaccccgt ctctactaaa aatacaaaat tagccgggct tggtggtgca	36226	•
tgcctataat cccagctact caggaggctg aggcaggaga atcacttgaa cctgggaggt	36286	
ggaggttgtg gtgagccaag atcgtgccat tgcactccag cctgggcaac aagagtgaaa	36346	10 70 70
ctccatccaa aaaaaaaaga aaagaaaaga aaaaaaagaa aagaaatttc agctgacaca	36406	
gcttcacact cttggttggg ttcccgtggt gaatgatgag gtcaggtgat gactggggat	36466	•
gacacetgge tgttteettg attacatete eegagagget gggetgtete etggetgeet	36526	•
togaaggtgt gggttttggc ctgggcccca tcgctccgtc tctagccatt ggggaagagc	36586	•
ctccccacca agcctctttc tctctcttcc ag at atc gat gag tgt cag gat	36638	••••
sp ile asp glu cys	gln asp	
335		
ccc gac acc tgc agc cag ctc tgc gtg aac ctg gag ggt ggc tac aag	36686	
pro asp thr cys ser gln leu cys val asn leu glu gly gly tyr lys		
340 345 350 355		
tgc cag tgt gag gaa ggc ttc cag ctg gac ccc cac acg aag gcc tgc	36734	
cys gln cys glu glu gly phe gln leu asp pro his thr lys ala cys		
360 365 370		٠
300	36784	
aag get gtg g gtgageaegg gaaggeggeg ggtgggggeg geeteaeeee		
lys ala val g		
375	36844	
ttgcaggcag cagtggtggg ggagtttcat cetetgaact ttgcacagac tcatatecee	20033	

tgaccgggag gctgtttgct cctgagggct ctggcagggg agtctgccgc cctgtta	gga 36904
cttgggcttg ccagggggat gcctgcatat gtcctagttt ttgggaatat ccagtta	acg 36964
gaaccctcag ccctactggt ggaacaggaa ccggctttcc tttcagggac aacctgg	gga 37024
gtgacttcaa ggggttaaag aaaaaaaatt agctgggcat ggtgccacac acctgtg	gtc 37084
ccagctactc agaaggctga ggcgggagga ttgcttgagg gcaggaggat tggttga	tcc 37144
toccacetea geeteeggag tagetgggae eteaggtgea tgeeactatg cetgget	aat 37204
tttctttttt cttttttt tttttcgag acggagtctc gctctgttgc ccaggct	gga 37264
gtgcagtggc aggatetegg etcaetgeaa geteegeete eegggtteae gecatte	
tgcctcagcc tccccagtag ctgggactac aggagcccgc cactgcacca ggccaat	ttt 37384
tttgtatttt tagtagagac ggggtttcac tgtgttagcc aggatggtct cgatctc	ctg 37444
acttegtgat eegeceaeet eggeetteea aagtgetegg attacaggeg tgageea	
cgcccagccg ctaattttca tatttttagt aaaaacaggg tttcaccatg ttggcca	ggc 37564
tagtettgaa eteetgaace caagtgatee teetgeettg geeteecaaa gtgetgg	gat 37624
tacagacacc acacctggct attattattt tttagagaca gggtgctgct ctatctt	cca 37684
gcctgtagtg cagtgcagcc tccatcatag ctcgctgcag ccttgacctc ctgggtt	cac 37744
gtgategtee egectaagee tetggaggag etgggagtae tggcatgtge caccatg	
ggttaatttt tttttttt tttttgagac agagtctcat tctgtcaccc aggctgg	
geggtggtge gatettgget tactgaaace tecaceteee aggtteeage aattete	
cctcaccct ctgagtagct gggattacag gttccggcta ccaaacctgg ctagttt	
tatgtttagt agagacaggg tttcaccatg ttggtgaggc tggtctcgat tctcccg	
cagcetecea aagtgetggg attacagget tgagecaceg tgeetggett tttttt	
ttttttttt gtggcaataa ggtctcattg tcttgcccag gctagcctta tgctcct	
ctcaagtgat cctcctccct cagcctccca aagtgctggg attacaggtg ggcgcca	
tgcctgttcc cgttgggagg tcttttccac cctcttttc tgggtgcctc ctctggc	
gccgcaccct gcaggatgac acaaggggat ggggaggcac tcttggttcc atcgacg	
cccctctgac cccctgacct cgctccccgg acccccag gc tcc atc gcc tac	
ly ser ile ala tyr	
	380
ttc ttc acc aac cgg cac gag gtc agg aag atg acg ctg gac cgg	
phe phe thr asn arg his glu val arg lys met thr leu asp arg	ser
385 390 395	30405
gag tac acc agc ctc atc ccc aac ctg agg aac gtg gtc gct ctg	
glu tyr thr ser leu ile pro asn leu arg asn val val ala leu	asp
400 405 410	aga 38543
acg gag gtg gcc agc aat aga atc tac tgg tct gac ctg tcc cag	•
thr glu val ala ser asn arg ile tyr trp ser asp leu ser gln	ard
415 420 425	. 38594
atg atc tgc ag gtgagcgtcg cccctgcctg cagccttggc ccgcaggtga	. 55554
met ile cys se	

gatgaggget cetggegetg atgecettet etecteetge eteag e ace eag ett r thr gln leu	38649
435	
gac aga gee cae gge gte tet tee tat gac ace gte ate age aga gae	38697
asp arg ala his gly val ser ser tyr asp thr val ile ser arg asp	
440 445 450	
ate cag gee eee gae ggg etg get gtg gae tgg ate eae age aac ate	38745
ile gln ala pro asp gly leu ala val asp trp ile his ser asn ile	,
455 460 465	
tac tgg acc gac tet gtc etg ggc act gtc tet gtt gcg gat acc aag	38793
tyr trp thr asp ser val leu gly thr val ser val ala asp thr lys	
	38841 . •
gge gtg aag agg aaa acg tta tte agg gag aac gge tee aag eea agg	30011
gly val lys arg lys thr leu phe arg glu asn gly ser lys pro arg	
400	38887
gee ate gtg gtg gat eet gtt eat gg gtgegtatee aegaegetga	30007
ala ile val val asp pro val his gl	·
500 505	38947
gggctgcaga gggaatggag ggagcaggaa ggagcttcag gaactggtta gtgggctggg	39007
catggtggct caaagcacct gtaatcccag cactttggga ggccaaggtg ggtggatcat	<u> </u>
caagaccage etgaccaaca tggtgaaace tegtetetae taaaaataca aaaattagee	39067
gggtgtggtg gtgggcacct gtaatcccag ctgctcggga ggctgaggca ggagaatcac	39127
ttgaacctgg gagatggagg ttgcagtgag ccaagacagc cccactgcac tccagcctgg	39187
gtgacagagt gagactccgt ctcaaaaaaa aaaaaaaaaa	39247
tggctagaca acaggatggt atcttccaag cccatggctg actcagcagc tcctgggtca	39307
agacactgtg acctgtgtcc cctggcagga agcatcgccc ctgccacctg cccggtgtac	39367
tctgtacctg tcaggtgaca tctgctacct aagcacgtga gaggtggcat ttcacagttt	39427
cagtgtggtg ctgacaaccc gggacgcaca ctgtccttgc agctacaatc aggaggtgaa	39487
tgttgggttt ccagcagaga acactggaga aggcacactt ggtgtctgga agggaaaagc	39547
agggaagaga gcatcatcag atgcctgcgg gtgaaggtgg gcccgctatg gccagcgtcc	39607
ctttttattt ttatttattt atttatttga gatggaatct cgctctgtcg cccagactgt	39667
agtgcagtgg tgcgatcacg gctcactgca agctccgcct cacaggttca cgccattctc	39727
ctgcctcagc ctcccgagta gctgggacta caggcacccg ccaccacgcc cggttaattt	39787
tttgcatttt tattagagac ggggtttcac cgcgttagcc aggatggtct aaatctcctg	39847
accetgtgat ceaceegeet eggeeteeet aagtgettgg attacaageg tgageeacea	39907
cgcccggccc cctttttatt ttttattttt tgagacggag tctcgctctg tcgcccaggc	39967
tagattgcag tggcgtgatc tcggctcact gcagcctccg cctcccaggt tcaagtgatt	40027
ctcctgcctc aacctcccaa ctaattagga ttacaagcat gtaccaccat gcctgactaa	40087
ttttttgtat ttttagtaga gactgggttt caccatgttg gctaggctgg tctcgaaccc	40147
ttagcctcaa gtaatctgcc tgcctcagcc tcccaaacag cggggattac aggcatgagc	40207
cactgtgccc aacccaaccc tggatctctt ttaaacaaga caatgctcgc tgttgccaca	40267
gaacaatggg tggggtacat gtggcccagt gtgtttggcc acataactgc caggccagag	40327
anneanogad oddadonene alabi a a a a a a a a a a a a a	

ggaaagagac totcagactg totccactca gatacaaatg tgtgtgttgt gtgcgtgtgt	40387
tctggtctca tatttgtttg ttttgagaca gggtgtcgct ctgtcactga gtctggagtg	40447
cagtggcgca atcagagttc actgcagect caaactettg ggctcagttg atteteccae	40507
ttcagcctcc caagtagctg gaactacagg tgaacaccac tgtgcccagc taatttattt	40567
tatttttagt agagatgagg teteactatg ttgeecagge tggtettgae etectageet	40627
caagcaatcc tectgeettg gteteccaaa gtgetgggat tacaegtgeg agecattgeg	40687
catggettgt gttettgtgt ttetteettt ttetttegag atggegtete agtetgeeae	40747
ccaggctgga gtgcagtggt gtgatcatag ctcactgtag cctcaacttc ctgggctcaa	40807
gcaatcetet tgattteage etecegggee tggeeageat ggtgaaaeee egtetetaet	40867
aaaaatacaa aaatgtagcc aggcgtggtg gtgggcgcct gtaatcccag ctacaccaga	40927
ggctgaggca ggagaatcgc ttgagcctgg aaggtggagg ttgcagcaag ccaagatcgt	40987
gccactgcac tccagcctgg gcaacagaga cagactctgt ctcaaaaaaa aaaaaaaaa	41047
acccaaacaa gccacatttg gagtttgggg ttcccagcag gactatttcc caagcctgag	41107
cctggctgtt tcttccagaa ttcgttgcac gcattggctg ggatcctccc ccgccctcca	41167
gcctcacage tattctctgt cctcccacca g c ttc atg tac tgg act gac tgg	41220
y phe met tyr trp thr asp trp	
510 515	
gga act ccc gcc aag atc aag aaa ggg ggc ctg aat ggt gtg gac atc	41268
gly thr pro ala lys ile lys lys gly gly leu asn gly val asp ile	
520 525 530	
tac tcg ctg gtg act gaa aac att cag tgg ccc aat ggc atc acc cta	41316
tyr ser leu val thr glu asn ile gln trp pro asn gly ile thr leu	
535 540 545	
g gtatgttcgc aggacagccg tcccagccag ggccgggcac aggctggagg	41367
a	
acagacgggg gttgccaggt ggctctggga caagcccaag ctgctccctg aaggtttccc	41427
totttotttt otttgttttt totttttttg agatgaggto ttggtotgto accoaggotg	41487
gagtgcactg gcgcaatcgt agctcactgc agcctccacc tcccaggctc aagtgatcct	41547
cctgcctcac cctcctgagt agctgagatt acagacacgt gccaccacgg cagactaatt	41607
ttattttatt tttgggaaga gacaaagtct tgttatgttg gcctggctgg tctcaaactc	41667
agggtgcaag cgatcctccc gcctcagcct tccaaactgc tgggattaca ggcgtgggcc	41727 41787
acceptaccca gcctccttga agtttttctg acctgcaact cccctacctg cccattggag	41787
agggcgtcac aggggagggg ttcaggctca catgtggttg gagctgcctc tccaggtgct	41947
tttctgctag gtccctggca gggggtcttc ctgcccggag cagcgtggcc aggccctcag	41963
gaccetetgg gaetggcate ageaegtgae eteteettat ceaettgtgt gtetag	
at ctc ctc agt ggc cgc ctc tac tgg gtt gac tcc aaa ctt cac tcc	42010
sp leu leu ser gly arg leu tyr trp val asp ser lys leu his ser	
550 555 560	42058
atc tca agc atc gat gtc aac ggg ggc aac cgg aag acc atc ttg gag	# 4 U D D
ale new and it was seed non district to her like the tile ion district the contract of the con	12000
ile ser ser ile asp val asn gly gly asn arg lys thr ile leu glu 565 570 575	12000

gat gaa aag agg ctg gcc cac ccc ttc tcc ttg gcc gtc ttt gag 42103 asp glu lys arg leu ala his pro phe ser leu ala val phe glu 590 585 580 gtgtggctta cgtacgagat gcaagcactt aggtggcgga tagacacaga ctatagatca ctcaagccaa gatgaacgca gaaaactggt tgtgactagg aggaggtctt agacctgagt .42223 tatttctatt ttcttctttc ttttttttt tttttttgag acagagtttt gctctcgttt 42283 42343 cccaggctgg agggcaatgg catgatctcg gctcaccgca acctccacct cccaggttca 42403 agtgattete etgteteagg etececagta getgggatta eaggeatgea ecaceaceat 42463 gcccggctaa ttttgtattt ttagtagaga cggagtttct ccatgttggt caggctggtc 42523 tegaacteee gaceteaggt gatetgeetg ceteggeete ceaaagtget gggattacag 42583 acttgagcca ccgcgcccag ctatttctgt tttctttctt tcttcttctt ctttttttt 42643 ttctaagága caggatetea etetgteece aggeaggagt geagtgetgt gateataget cactgoagee ttaacetect gggeteaagt gatetteeca ceteageete ceaagtaget 42703 42763 ggaactacag gtgcacacca ccatgcccag ctcatttttg tattttttt ttttttgaga 42823 cagtctcgtt ctgtcacccc ggctggagtg cagtggtaca atcttggctc actgcaacct 42883 ctgcctccca ggttcaagcg attctcctgc ctcagcctcc tgagtagttg agattacagg 42943 catgtgtgcc atcatacctg gctgattttt gtattttttt ttagagatgg ggtctcagta 43003 tgttgaccag gcttgtctta aactcccggc ctcaagtgat cctccactt cagtctccca aagtgctggg attacaggca tgagccactg cggccggttt gttttctttt ttttttcgtt 43063 43123 ttttggagac ggaatttcac ctttgttgcc caggatggag tgcaatggca cgatatcgcc 43183 tcaccacaac ctctgcctcc tgggttcaaa ccattttcct gcctcagcct tcttagtagc tgggattaca agcatgtgcc accacgcccg gctgattttg tatttttagt agagatgggg 43243 tttctccatg ttggccaggc tggtctcgaa ctcctgacct caggtcattc gcccacctct 43303 43363 gcctcccaaa gtgctgggat tacaggcgtg agccaccgtg cccggtggtt tgtattcttt ttactgagag tcgtgaaagg cagtgatcct ctgtcacatg tgatcttggc tctcagggga 43423 43483 catttggcaa tttctagaga ttttttggtt gtcacaagtc aatggggaag actgttggca tttagtgggt agaggctggt gacgctgctg aacacccaga acagggaagt agcaggccct 43543 agatagagee ategtgggga aaccetgete taaggaaatg gegetatttt ataacceeac 43603 43663 gttcctggca tgattaccaa cagccaaaag tggagtcccc ccaagtgtgt tcgtccattt gcattgcagt aaaggaatag ctgaggccgg gtaatttata aagaaaagag atttaaactg 43723 ggtatggcag tttatgccta taatcccaga actttgggag gctgaggcag gaggatcgct 43783 43843 tgagtccagg agtgtgagac cgagaccagc ctggccaaca tgacgaaact ctgtctctac 43903 aaaaaataca aaaagtaggc caggcacggt ggttcacgcc tgtaatccca gcactttggg aggccgaggc gggcggatca cgaggtcagg agatcgagac catcctggct aacacggtga 43963 44023 aaccccgtct ctactaaaaa tacaaaaaca aaattagccg ggtgtggtgg caggcgcctg 44083 tagtcccage tactcgggag getgaggegg gagaatggcg tgaacccggg aggcggagct 44143 tgcagtgage caagategeg ceactgcact ceageetggg tgacegagtt gagaeteegt 44203 ctcaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaataca aaaagtagcc aggtgtggtg gcaggcacct 44263 gtaatcctgg gttctcgaga ccgaggcatg agaattgcct gaccccagga ggtggaggct 44323 gcagtgagcc aagatcatgc cactgcactc cagcctgggc gacagagtgg gactctgtct 44383 caaaaaacaa caaaaaaaaa gttctggaaa tggatggtgg tgatggtgat acttccacaa 44443 cagcgtgaat ctgcttaagg ccaccgaact gtgcactcac aaatagtcga gatggtacat

ź

#

•	
tttatgttat gtgtatttca ccacaattaa aaactagttg tgggccaggt gtggtggttc	44503
atgcctgtaa tcccagcact ttgggaggtc agagggaggt ggatcatgag gtcagcagtt	44563
cgagaccagc caggccaaca tggtgaaacc ccatctctac taaaaataca aaaattagcc	44623
aggegtggtg geacatgeet gtagteecag etaettgaga ggetgaagea ggagaatege	44683
ttgaacctgg gaggctaaga ttgcagtgag ccgagatcgt gccactgcac tccagcctgg	44743
acgacagagt gagacttcgt ctcaaaaaaa aaaccaaaaa aaaaattagc tgtgggtcag	44803
gcactgtggc tcacgcctgt aatcccagca ctttgggaga ccgaggtagg tggatggcct	44863
gaggtcagga gttcgaatcc agcctggcca acatggtgaa agcccgtctc tactaaaaat	44923
acaaaaaatt agtcaggtat gttggcacac ctgtaatccc agctactcgg gaggctgaag	44983
caagagaatc gtttgaaccc aggaggtgga cgttgcagtg agccgagatt gggccactgt	45043
actecageet gggeaacaaa agtgaaacte tgtetgaaac aaacaaacaa acaaacaaac	45103
agacaaacaa aaaaactagt tgtggagaga gggtggcctg tgtctcatcc cagtgtttaa	45163
cgggatttgt catcttcctt gctgcctgtt tag gac aaa gta ttt tgg aca gat	45217
asp lys val phe trp thr asp	
595 600	•
atc atc aac gaa gcc att ttc agt gcc aac cgc ctc aca ggt tcc gat	45265
ile ile asn glu ala ile phe ser ala asn arg leu thr gly ser asp	:-
605 610 615	
gtc aac ttg ttg gct gaa aac cta ctg tcc cca gag gat atg gtt ctc	45313
val asn leu leu ala glu asn leu leu ser pro glu asp met val leu	:
620 625 630	•
ttc cac aac ctc acc cag cca aga g gtaagggtgg gtcagcccca	45358
phe his asn leu thr gln pro arg g	;*
635 640	•
ccccccaac cttgaaacct ccttgtggaa actctggaat gttctggaaa tttctggaat	45418
cttctggtat agctgatgat ctcgttcctg ccctgactcc gcttcttctg ccccag	45474
ga gtg aac tgg tgt gag agg acc acc ctg agc aat ggc ggc tgc cag	45521
ly val asn trp cys glu arg thr thr leu ser asn gly gly cys gln	
645 650 655	••
tat ctg tgc ctc cct gcc ccg cag atc aac ccc cac tcg ccc aag ttt	45569 ••
tyr leu cys leu pro ala pro gln ile asn pro his ser pro lys phe	
660 665 670	
ace tge gee tge eeg gae gge atg etg etg gee agg gae atg agg age	45.645
	45617
thr cys ala cys pro asp gly met leu leu ala arg asp met arg ser	4561/
thr cys ala cys pro asp gly met leu leu ala arg asp met arg ser 675 680 685	45617
	45667
675 680 685	
675 680 685 tgc ctc aca g gtgtggcaca cgccttgttt ctgcgtcctg tgtcctccaa	
675 680 685 tgc ctc aca g gtgtggcaca cgccttgttt ctgcgtcctg tgtcctccaa cys leu thr g	
675 680 685 tgc ctc aca g gtgtggcaca cgccttgttt ctgcgtcctg tgtcctccaa cys leu thr g 690	45667 .
675 680 685 tgc ctc aca g gtgtggcaca cgccttgttt ctgcgtcctg tgtcctccaa cys leu thr g 690 ctgccccctc ctgagcctct ctctgctcat ctgtcaaatg ggtacctcaa ggtcgttgta	45667 45727
675 680 685 tgc ctc aca g gtgtggcaca cgccttgttt ctgcgtcctg tgtcctccaa cys leu thr g 690 ctgcccctc ctgagcctct ctctgctcat ctgtcaaatg ggtacctcaa ggtcgttgta aggactcatg agtcgggata accatacttt tcttggatgg acacatcagc accgggcttg	45667 45727 45787

tetttattit tttetttga gatttgetgt cacceageet ggaatgeagt ggtgccatet 45967 46027 tggctcactg ctacctctcc cactgggttc aagcaattct cctgcctcag cctcccaagt 46087 agctgggatt acaagcatgc gccaccatgc ctggctaagt tttgtatttt tagtacagac 46147 agggtttctc catggtggcc aggctggtct tgaactcctg acctcaggtg atcctcccac 46207 ctotgcctcc cgaagtgcta cgattacagg catgagccac cgcgcccatc cccctttgtt 46267 gacttttctc atcctctgag aaagtctcag ttgaggccag cacctccctc aagtgaattg 46327 aatctccctt ttgaacaaca acaaataaca atatgaccca gacgtggtgg ctcacacctg 46387 tggtcccagc tactcgggag gctgaggtgt gaggattgct tgagcccagg aggtcaaggc tacagagage tataateaca ceaetteact ceageetggg ggacaaagtg aaaccetgte 46447 46507 tgaaaaaaac aaaaaaagaa aaaggaaaaa gaaacaatac gatcacaaag tagatattca 46567 tagtgtttat tttcagtact ctttttttt tttttttt tttttttt tttttgagac ggagtcttgc tctgttgccc aggctggagt gcagtggcac gatcttggct cactgcagcc tctgcctccc 46627 aggttcaage gettggetca etgeaacete egeeteetgg gttcaagege ttettetgee 46687 46747 tcagcctccc cagtagctgg gactataggc acgtcccact acgcccagct aattttttgt 46807 attttttagt agagatgggg tttcactatg ttagccagga tggtctcgat ctcctgacct 46867 cgtgatctgc ctgccttggg ctcccaaagt gttgggatta tgggcatgag ccactgcacc 46927 tggccttttt tttttttt tttgagatgg agtttcgctc ttgttgccca ggctggagtg 46987 caatggtgtg atctcggctc actgcaacct ctgcctcctg ggttcaagca attctcctgc 47047 ctcagcctcc cgagtagctg ggattacagg cacctgccac cacgcctggc taatttttgt 47107 acttttagta gagacggggt ttctccatgt tggtcaggct ggtctcaaac tcctgacctc 47167 aggtgateca eccaectegg ecteceaaag ttetgggatt acagacatga gecaecgege ctggccgtgt ctggcctttt ttagttattt ctttttttt tttttttt tttgagacag 47227 47287 agtettacte egtegeecag getggagtge ageggtgega tgtetgegea etgeaagete cgcccctgg gttcatgcca ttctcctgcc tcagccttct gagtagctgg gactgcaggc 47347 gcctgccact acgcccggct acttttttgt atatttagta gagatggagt ttcactgtgt 47407 tagccaggat ggtctcgatc tcctgacttt gtgatccgcc cgcctcggcc tcccaaagtg 47467 ctgggattac aggcgtgagc caccatgcca ggcttttttt ttttttttt tttttgagac 47527 47587 ggagtettge tetgtegeee aggetggagt geagtgeeat gateteaget caetgeaage tocacttocc aggeteacge cattetecag ceteageete ceaagtaget gagactacag 47647 gggcccgcca ccacactcgg ctaattttt tgtattttta gtagagacgg ggtttcacca 47707 tgttagecag getggtettg aacteetaac etcaggegat teacetgeet eggeeteeca 47767 47827 aagtgctggg attaaaggta tgagccacct cgcctggtgt gagccacctc gcccagcctg agccacctca cccagcctaa gccactgtgc ctggcctgat tttggacttt ttaaaaaattt 47887 47947 tattaataat tatttttggg tttctttttt ttgagacagg gtcttactct gtcatccagg 48007 ccatcctgtc tgtctgtcat cccagtgatg ggatcatacc ttgctgcagc ctctacctcc 48067 tgggctcaag cgatcctccc ccctcagcct cctgagtagc tgggagtaca ggtgtgcacc 48127 accacacctg gctaattttt ttttttttt ttgtatatag agatggtatt ttgccatgtt 48187 gaccaggeta gtcttaaact cctggactca ctcaagagat cctcctgcct tggcctccca 48247 aggtcatttg agactttcgt cattaggcgc acacctatga gaagggcctg caggcacgtg gcactcagaa gacgtttatt tattctttca g ag gct gag gct gca gtg gcc acc 48301 lu ala glu ala ala val ala thr

695 700

cag gag aca tec ace gte agg eta aag gte age tee aca gee gte	a agg 48349
gln glu thr ser thr val arg leu lys val ser ser thr ala val	l arg
705 710 715	5
aca cag cac aca acc acc cga cct gtt ccc gac acc tcc cgg ct	g cct 48397
thr gln his thr thr thr arg pro val pro asp thr ser arg le	ı pro
720 725 730	
ggg gcc acc cct ggg ctc acc acg gtg gag ata gtg aca atg tc	t cac 48445
gly ala thr pro gly leu thr thr val glu ile val thr met se	r his
735 740 745	
.caa g gtaaagactg ggccctccct aggcccctct tcacccagag acgggtcc	ct 48499
gln a	
750	
tcagtggcca cgaacatttt ggtcacgaga tggagtccag gtgtcgtcct cactc	ccttg 48559
ctgaccttct ctcacttggg ccgtgtgtct ctgggccctc agtttcccta tctgt	aaagt 48619
gggtctaata acagttcttg ccctctttgc aaggattaaa tgggccaaat catat	gaggg 48679
gccaggtcct tcaggctcct ggttcccaaa gtcagccacg caccgtgtgg gtccc	aaaat 48739
tttatcaagg cacattcgtt gcctcagctt caggcatctg cccaaaaagg ccagg	actaa 48799
ggcaaggaga gggagggatt cctcagtact cagcttttca cagaggctcc aaaag	gctaa 48859
ggaatccagt aacgttttaa cacaatttta caatttttt ttttgagacg gagtt	ttgct 48919
cttgttgccc aggctggagt gcagtggcac gatctcggct cactgcaacc tctgg	ctccc 48979
gggttcaage gatteteetg ceteagtete eegagtaget gggattacag geatg	cgcca 49039
ccacgetegg ctaattttgt atttttagta cagaaggggc ttetetgttg gtcag	
togtgaacto toaacotoag gtgagocaco ogcotgagoo toccaaagtg otggg	
aggtgtgagc caccacgcct ggcctttttt ttgagacaga gtctcgctct cgccc	
gtactgcagt gacgcagtct gggctcactg taacctccgc ttcccaggtt caagt	
ttctgccgca gcctcccatg tagagtagct gggattacag gcacccgcca ccatg	
ctaattettg catttttagt agagatgggg tttcacagtg ttggccagge tggtc	
cttctgacct caagtcatct gcctgccttg gccctgccaa agtgctggga ttata	_
gagccaccgc gcctggccta cagtttattc tttggtggct cacacctgta atctc	
tttgggagge caaggtggga gaatggettg ageceaggag ttcaagteca geetg	
catagcaaga cectatetet actacaaaat aaataataaa taaactaatt ttttt	
taaaacccaa ctattcaaca tggcaatgca atatattaaa aaaattttt ttttc	
aacggagtet eteaetgtea ecegggetgg agtgeagtgt egecatettg getea	
accteegeet eccaggteea agtgattete etgetteage etceegagta getgg	
caggeaccea ceaccatace cagetaatat ttttgtattt ttagtagaga tgggg	
ctatgttggg caggctggtc tggaactcct gacctcgtga tctgcccgag gatcg	
ctcccaaagt getggggatt geaggeatga gecaeegtge ceagecaaaa etttt	
tttattttt tgggacacgg tctcactgtg taccccagac tggagtgata gagtg	
atggeteact geagecteaa ceteeetggg eteaggtgat etteetgett eagte	
ggtagetggg actacaggca tgagecacca cacccageta attititgaat titti	
agacagggtt tcaccttgtg gcccagactt gtctctaact ccagggctca agcga	
ccaccttggc ctcccaaagt gctgagatta atgcaattta aaaaattttt tggcc	
,	

,,;

tggtggctca tgcctgtatt cacaacacct tgggaggcaa aggtgggcag atcacttgag 50359 gtcaggagtt cgagactagc ctggccaaca tggtgaaacc ccctgtctac taaaaaaata 50419 caaaaattac ctgggcacag tggtgggtgc ctgtaatccc agctacttgg gatgctgagg 50479 gtggagaatt gcttgaacct gggaggcaga agttgcagta agccaagatc atgccactgg 50539 actecageet cagtgacaga geaaaaetet gtetecaaaa aaattgtttt tttttttt 50599 ttttcaaatc atcacactac agccaaggcc tggccactta cttttgtaaa taaagtttta 50659 ttggagccag tggaccagtg aggccgaatc ttgcaggtgt aagatcacag tctatccttg 50719 aaaattttga tattttgttc attgggtggt ttttcattaa tttaaatttt aaaaaataac 50779 atattaaagg ctggtgtgga ggtgcacgcc tgcagtccta gctactccca gaggctgagg 50839 cgggagactt gcttgagccc aagagttgaa gtccagcctg ggcaacatag cgagaccccc 50899 atctctaaaa ataaaaataa tgcattagaa tattattgga ttcctgggca gggcacagtg 50959 gctcacacct gtaatcccag cactttggga ggctgaggtg ggtggatcac ctgaggtcag 51019 gagtttgaga ccagcctggc caacatggtg aaaccccgtc tctactaaaa atacaaaaat 51079 tagccaggcg tggtggcagg tgcctgtaat cccagctact cgggaggctg aagcacgaga 51139 atcgcttgaa tccaggaggc ggaggttgca gtgagctgag attgcgccat tgcactccag 51199 cctggaggac aagagtgaaa ctccattccc ctctgcaaag aaaaggaata ttatcagatt 51259 cctaagettt ttggctcccc ctttagtttg ggggctgggg tggtgagtgt ctgacctggc 51319 ctcactgtcc tccctggatg tgatgagacc caggtgtggg tcaggatgtc attcgtttgt 51379 ccaccagagg gcgcccaaac tgctttgagc tgctgggaaa tggtgctcct agacttttag 51439 caaacaaaca aaaaaaatg gcacatcggc aaatttcaga ccattcttt tttttttt 51499 tttggttcca gagtagctga aatctttgtt cagttacaag caggataaaa tggaaactgc 51559 ctgggagagg ctgagaaacc ttcttgcttg ggggaggtgg ggcactgcta gaattaatcg 51619 cttcacagac cagcccatcc aggactcctc aaatttggca aaaaagccat tcattcattc 51579 atteatttat gtagagaega gggggatetg getatattge etagattggt eteaaattee 51739 tggcctcaag tgatcctcct gccttggtct actaatgtgc tgcgattaca ggcatgagcc 51799 acceptecta getetagteg acttegaate ttecettece caeegceett atettegaate 51859 gcccaggtcc acttgtatgg ttctgtacca aggttaaccc catcccataa tgcctgggac 51919 agttgatgca ggacaatcag cttctgtgcc attcaacctc aggactgagc atgctgggca 51979 ttgtggggtc cgaaggtggc tcccctgtcc ccttcaaaat accctcttt tctttcttc 52039 52099 ttttttttt tttttttt ttgagacgaa gtcttgctct gttgccccag ctagagtgca 52159 gtggtgcgat ctcagctccc cgcaacctct gcttcccggg ttcaggcgat tctcctgcct cageeteetg agtagetggg attacaggtg eccaeegeea eagetggeta atttttgtat 52219 ttttagtaga gacagggttt caccgtgttg gccaggctgg tcttgaactc ctgacctcag 52279 gcaacctgcc cacctcagcc tcccaaagtg ctgggattac aggtttgagc cactgggcct 52339 ggcctttttt ttttttttt gagagggagt ctcactctgt tgcccaggct ggagtgcaat 52399 ggcgcgatct tgactcactg caactccatt tcccgggttc aagtgattet cctccctcag 52459 cctcccaagt agctgggatt acaggtgcat gccaccacgg ccagctaatt ttgtattttt 52519 agtagagaca gggtttcact: atgttgatca tgctggtctc aaactcctga ccttaggtga 52579 tetgeeegee ttageeteee aaagtgttgg gattacaggt gtgageeace gegeeeagae 52639 caaaatatgc tcattttaat aaaatgcaca agtaggttga caagaatttc acctgcaacc 52699 ttgtcaacca cctagaataa aagcctctgc agccctcccc taaagactca tcaatgtgag 52759 gctcaagaac cttcttaggc tgggctcggt ggctcatttc tgtaatccct gcactttgga 52819

7

\cdot	
aggetgagge aggaggatet ettgaggeea ggagtteaag acaageetgg geaacatage	52879
cagacetetg tttetatece ceacaaaaag aacettetta aaceggaatt gagteetaca	52939
acctcgataa ctcacaaata agcccgtgtg gcctctcaca gacttgggaa gttctccaag	52999
tgtccaggga gatgtgccag gcgctttcct gccgtgacca ccgtcctctg cctgctccat	53059
ttettggtgg cetteettta gacetgggee teactettge tteteteetg cag et etg.	53117
la leu	
750	
ggc gac gtt gct ggc aga gga aat gag aag aag ccc agt agc gtg agg	53165
gly asp val ala gly arg gly asn glu lys lys pro ser ser val arg	
755 760 765	
gct ctg tcc att gtc ctc ccc atc g gtaagcgcgg gccggtcccc	53210
ala leu ser ile val leu pro ile v	
770 775	
cagogtocco caggtoacag cotocogota tgtgacotog tgcctggctg gttgggcctg	53270
ttcacttttt ctcctggaca gggaacagcc ccactggtgt cctttatcac ccccacggcc	53330
teteetgget tggggetgae agtgaeaaga teagaeaget aaggggteag atggaggatg	53390 ••
tggagetggg tecegtgetg tggaatagee teacegagat ttgagtgeet tetggggaae	53450
tggttccctt gcagggggct gtgtggagag gcgcgctctc cctgcctcac ccatgctcat	53510
cctaactcgg ttaccatcac atctctttt tcttttttc ttaaatttta agaaaaaaga	53570
aatttaattt ttttgagaga cagagtettg etetgteace caggetggag tgeagtggca	53630
ccatcatgcc tcgctgcagc ctcaatgtct gggctcaagc gatcctccca cctcagcctc	53690
ctgagtagct ggtgcaagcc actatacccc acttcctatt tcttaaaaag tcacagccct	53750
gtgtgtggct aatcctggac agaaatctag aagaagtcag ctacttctgg ggcgtggctc	53810
acccagtggg cttcaggtta gatatttctt atacttatga ggctgggtgt ggtggcttat	53870
gcctgtaatc ccagcacttt gggaggctga agtgggtgga ttgcttgggc tcaggagttc	53930
gagaccaacc tgggcaacat ggcgaaaccc tgtttctaga aaaggtacaa aaattagctg	53990
ggcaggtggc acgtgcctgt ggtaccagct acttgagggc ctgaggcagg aggatcgctt	54050
gaacctggga ggtcgaggtt gcagtgaact gagatcatgt cactgcactc cagcctggtg	54110
acagagcaag accccgtctc aaaaaaaaaa aaagaaagaa aaaaattctt atgcatagat	54170
ttgcctcttt tctgtttgtt tgttttgaga tggagtctcg ctctgtcgcc caggctggag	54230
tacagtgget caacetegge teactgeaac etetgeetee egggtteaag caatteteet	54290
geeteageet cetgagtage tgggactaca gegeeegeea ecatgeeeag etaatttttg	54350
tatttttagt agagactgac tgggtttcat catgttggcc aggctggtct cgaactcttg	54410
acctcatgat ccgcccgcct cagcctccca aaatgctggg attacaggcg tgagccacca	54470
ggcccaggcc gcaaggcgat ctctaaacaa acataaaaga ccaggagtca aggttatggt	54530
acgatgcccg tgttttcact ccagccacgg agctgggtct ctggtctcgg gggcagctgt	54590
gtgacagage gtgcctctcc ctacag tg ctc ctc gtc ttc ctt tgc ctg ggg	54642
al leu leu val phe leu cys leu gly	
780	
gto tto ott ota tgg aag aac tgg ogg ott aag aac atc aac agc atc	54690
val phe leu leu trp lys asn trp arg leu lys asn ile asn ser ile	
785	
•	

	The man and and are car	54738	
	and the day and coc ofc tat cag and acc aca gag gat gag get		
	asn phe asp asn pro val tyr gln lys thr thr glu asp glu val his		
	805	54784	
•	att tgc cac aac cag gac ggc tac agc tac ccc tcg gtgagtgacc		
	ile cys his asm glm asp gly tyr ser tyr pro ser	•	
	820 825	54844	•
	ctctctagaa agccagagcc catggcggcc ccctcccagc tggaggcata tgatcctcaa	54904	
	gggaccagge cgaggettee ecagecetee agategagga cageattagg tgaatgette	54964	
	tgtgcgctca ttcagaatgt cagcggacaa tggccttggt ggtgtagagg aatgttggat	55024	
	aagcaaatag agagctccat cagatggtga cagggcaaag aaagtcaaaa ggagttcaga	55084	
	ggccgggcgc ggtggctcat gcctgtaatc ccaggacttt gggaggccga ggctggcgga	55144	•
	tcacctgaag tcaggagttt gagaccagct tggccatcat gacaaaaccc cgtctctatt	55204	
	aaaaatacaa aaaattagcc aggcgtggga gtgggcgcct gtaatcccag ctactcggga	55264	: : .
	ggccgaggta gaaaaatcgc ttgaacctag gaggcagagg ttgcagtgag ccgagatcgc	55324	:
	gccactgcat tecagecegg gaggeaagag caaaacteca teteaaaaaa aaaaaaaaaa gccactgcat tecagecegg gaggeaagag caaaacteca teteaaaaaa aaaaaaaaaa	55384	••••••
	ggagttcaga ggcccggcat ggtggttcac acatgtgatc ccagaacttg gggaggttga	55444	
	ggcaggagaa tcacctgagc tcagagttca agaccagcct gggcagcaca gcaagacccc	55504	
	atctctgcaa aaaataaaaa tttagcccag tgtggtgatg agcgcctagt tccagctact	55564	•
	agggaggeta aggeaggagg attgettgag getaaggtag gagattgaga etgeagtgae	55624	•••••
	ttgtgattgc gtcactgcgc tccagcctgg gtgacagagc aagcccttgt ctcttaaaaa	55684	
	aaaaaaaaa ttcaaagaag ggtttccaga gggccaggag ggaggaaggg agaggaggtg	55744	
	tttatttt ttgcttttat ttttatttt gagacagagt ctctctctgt cacccaggtt	55804	: :::
	ggagtgcagt gctgtgatct tggctcactg caacttctgc ctcctgggtt caagcaattc	55864	
	ttatgcctca gcctcagcct cctgagtagc tgggattaca acactatgcc cgggtaattt		
	ttgtattttt agtagagacg aggtttcgcc atgttgccca gactggtctc gaactcctga		•
	ceteaagtga tecaceegee ttggeeteee caegtgetgg gattgeagge gtgageeact		
	gcgcccgcct tgatctttac acaaggggtt tagggtaggt agccttctct gaaccaggag		
	aacagectgt gegaaggeec tgaggetgga cegtgeetgt tgggtttgag geegttgtag		
	ctggagcaaa cagagagag ggtaaaaagg caggaggcta ccaggcaggt tgtgcagagc		•••
	cttgtgggcc actggggagg actttggctt ttgccctgag agcggtggga agtgactgaa	56284	• • • •
	teeggtacte acceptetece tetggegget cetgggggaa catgettggg gateaggetg	56344	
	ggggaggctg ccaggcccag gaggtgagaa gtaggtggcc tccagccgtg tttcctgaat	56399	
	gctggactga tagtttccgc tgtttaccat ttgttggcag aga cag atg gtc agt arg gln met val ser		
	830		
		56447	
	ctg gag gat gac gtg gcg tgaacatctg cctggagtcc cgtccctgcc		
	leu glu asp asp val ala		•
	835	c 56507	-
	cagaaccett cetgagacet egeeggeett gttttattea aagacagaga agaccaaage	g 56567	
	attgcctgcc agagctttgt tttatatatt tattcatctg ggaggcagaa caggcttcg	t 56627	•
	and the same transfer of the s		
	acagtgccca tgcaatggcc tgssttsss aagagaaaca ggcccggggg gaccaggatg acacctccat ttctctccag gaagttttg		

56747 gtttctctcc accgtgacac aatcctcaaa catggaagat gaaaggggag gggatgtcag 56807 gcccagagaa gcaagtggct ttcaacacac aacagcagat ggcaccaacg ggaccccctg 56867 gccctgcctc atccaccaat ctctaagcca aacccctaaa ctcaggagtc aacgtgttta 56927 cctcttctat gcaagccttg ctagacagcc aggttagcct ttgccctgtc acccccgaat 56987 catgacccac ccagtgtctt tcgaggtggg tttgtacctt ccttaagcca ggaaagggat 57047 tcatggcgtc ggaaatgatc tggctgaatc cgtggtggca ccgagaccaa actcattcac 57107 caaatgatgc cacttcccag aggcagagcc tgagtcactg gtcaccctta atatttatta 57167 agtgcctgag acacccggtt accttggccg tgaggacacg tggcctgcac ccaggtgtgg ctgtcaggac accagectgg tgcccatect eccgaecect acceaettee attecegtgg 57227 57287 teteettgea ettteteagt teagagttgt acaetgtgta eatttggeat ttgtgttatt 57347 gtcaatgaat geeggggaca gagaggggea ggttgaeegg gaetteaaag eegtgategt 57404 57467 gaatatcgag aactgccatt gtcgtcttta tgtccgccca cctagtgctt ccacttctat 57527 gcaaatgcct ccaagccatt cacttcccca atcttgtcgt tgatgggtat gtgtttaaaa catgcacggt gaggccgggc gcagtggctc acgcctgtaa tcccagcact ttgggaggcc 57587 gaggegggtg gateatgagg teaggagate gagaecatee tggetaacae gtgaaaceee 57647 gtctctacta aaaatacaaa aaattagccg ggcgtggtgg cgggcacctg tagtcccagc 57707 tactcgggag gctgaggcag gagaatggtg tgaacccggg aagcggagct tgcagtgagc 57767 cgagattgcg ccactgcagt ccgcagtctg gcctgggcga cagagcgaga ctccgtctca 57827 aaaaaaaaaa acaaaaaaa accatgcatg gtgcatcagc agcccatggc ctctggccag 57887 gcatggcgag gctgaggtgg gaggatggtt tgagctcagg catttgaggc tgtcgtgagc 57947 tatgattatg ccactgcttt ccagcctggg caacatagta agaccccatc tcttaaaaaa 58007 tgaatttggc cagacacagg tgcctcacgc ctgtaatccc agcactttgg gaggctgagc 58067 tggatcactt gagttcagga gttggagacc aggcctgagc aacaaagcga gatcccatct 58127 ctacaaaaac caaaaagtta aaaatcagct gggtacggtg gcacgtgcct gtgatcccag 58187 58247 ctacttggga ggctgaggca ggaggatcgc ctgagcccag gaggtggagg ttgcagtgag 58307 ccatgatcga gccactgcac tccagcctgg gcaacagatg aagaccctat ttcagaaata 58367 caactataaa aaaataaata aatcctccag tctggatcgt ttgacgggac ttcaggttct 58427 ttctgaaatc gccgtgttac tgttgcactg atgtccggag agacagtgac agcctccgtc agactcccgc gtgaagatgt cacaagggat tggcaattgt ccccagggac aaaacactgt 58487 58547 gtcccccca gtgcagggaa ccgtgataag cctttctggt ttcggagcac gtaaatgcgt ccctgtacag atagtgggga ttttttgtta tgtttgcact ttgtatattg gttgaaactg 58607 ttatcactta tatatata tatacacaca tatatataaa atctatttat ttttgcaaac 58667 58727 cctggttgct gtatttgttc agtgactatt ctcggggccc tgtgtagggg gttattgcct 58787 ctgaaatgcc tcttctttat gtacaaagat tatttgcacg aactggactg tgtgcaacgc tttttgggag aatgatgtcc ccgttgtatg tatgagtggc ttctgggaga tgggtgtcac 58847 58907 tttttaaacc actgtataga aggtttttgt agcctgaatg tcttactgtg atcaattaaa 58967 tttcttaaat gaaccaattt gtctaaactc gatgcacgtt cttctgttcg cgcgcttctt 59027 tttgtttttt ttttttcct gagatggagc ctggctctgt cacccctggc tggagtgcag 59087 tggcatgatc tcggcttact gcaagctccg cctcccaggt tcaagcaatt ctcctgcctc 59147 agcctcccta gtagctagga ttacaggtga gtgccaccac gcctggccaa ttttttttt 59207 tttttttttt ttgagacaga gtctcgctct gtcacccagg ctggagtgca gtggtgtgat

ctcggctcac tgcaagctct gcctcccagg ttaatgccat tctcctgtct cagcctcctg	59267	
agtagetggg gecaeaggeg cetgecaeca egeceggeta atttttttt gtaettettt	59327	
tagtacagae ggggtttcae catgttagee aggatggtet egateteetg acettgtgat	59 <u>.</u> 387	
ccacctgctt cggcctccca aagtgctgag attacaggcg tgagccaccg cgggtggcca	59447	
acqctaattt ttttgttttt ttagatggag tcttgctctg tcgcccaggc tggagtgcag	59507	
tggcgtgate tetgeetact gcaageteeg esteeegggt teatgeeatt etectgeete	59567	
agcetectga gtaaetggga etacaggeae eegecaceae geeeggetaa ttttttgtat	59627	
ttttagtaga gacagggttt caccgtgtta gccaggatgg tcttgatctc ctgaccttgt	59687	•
gatccacccg teteggeete ecaaagtget gggattagag gtgtgageea ecaeacetgg	59747	
cctagcctgg ctaatttttg tatttttggt agagacgggg tttcaccatg ttggtcaggc	59807	
tggtcttgaa cttctgacct caggtaatct gcctgcctca gtctcccaaa gtgctgggat	59867	
tacaggtgtg agccaccgcg cctggcctca cttccttctg tcatctgttt gtggattgga	59927	
ctccccagga gaaggaccca gaaggggaag actcccagaa ctccgggcaa gatgcaatct	59987 60000	
ccgtgggctg cca	60000	•••
010. GTO TO 10. 0		••••
<210> SEQ ID NO.: 2		
<211>24		••••
<212> polinucleótido		•
<213> secuencia artificial		
<220>		
<221> cebador		•
<223> Ex1F		
<400>		*
cacattgaaa tgctgtaaat gacg		••
		7
<210> SEQ ID NO.: 3		
<211>24		
<212> polinucleótido		
<213> secuencia artificial		••••
<220>		
<221> cebador		

<223> Ex1R <400>

ctattctggc gcctggagca agcc

<210> SEQ ID NO.: 4			
<211> 24		•	
<212> polinucleótido			
<213> secuencia artificial			
<220>		,	
<221> cebador			
<223> Ex2F		•	
<400>	•		
ttgagagacc ctttctcctt ttcc	•		
<210> SEQ ID NO.: 5		•	
<211> 20			
<212> polinucleótido			
<213> secuencia artificial			
<220>			
<221> cebador			
<223> Ex2R			
<400>			
gcatatcatg cccaaagggg			
<210> SEQ ID NO.: 6			
<211>24			
<212> polinucleótido			
<213> secuencia artificial			
<220>			
<221> cebador			
<223> Ex3F			
<400>			
ttcctttgag tgacagttca atcc			
<210> SEQ ID NO.: 7	•		
<211>24			
<212> polinucleótido			
-12 Pointedate			

<213> secuencia artificial	
<220>	
<221> cebador	
<223> Ex3R	
<400>	
gataggctca atagcaaagg cagg	
<210> SEQ ID NO.: 8	
<211>24	
<212> polinucleótido	
<213> secuencia artificial	
<220>	•
<221> cebador	
<223> Mut191-2F	: :
<400>	••••
acagttcaat cctgtctctt ctct	
<210> SEQ ID NO.: 9	**
<211> 10	
<212> polinucleótido	****
<213> secuencia artificial	*****
<220>	
<221> cebador	9 - 6 × 6 × 6 × 6 × 6 × 6 × 6 × 6 × 6 × 6
<223> Ex4AF	
<400>	
gtggtctcgg ccatccatcc	
<210> SEQ ID NO.: 10	
<211>20	
<212> polinucleótido	·
<213> secuencia artificial	
<220>	
<221> cebador	
~221 Country	

<223> Ex4ARF
<400>
agccatcttc gcagtcgggg
<210> SEQ ID NO.: 11
<211> 12
<212> polinucleótido
•
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<223> Mut 509insCR
<400>
cgagccatct tcgcagtcgg ag
<210> SEQ ID NO.: 12
<211>20
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<223> Ex4BF
<400>
ccccagetg tgggcctgcg
<210> SEQ ID NO.: 13
<211>20
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<223> Ex4BR
<400>

cgccccacc ctgccccgcc

<210> SEQ ID NO.: 14
<211> 20
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<223> Ex6F
<400>
tecteettee tetetetgge
<210> SEQ ID NO.: 15
<211> 20
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<223> Ex6R
<400>
totgcaagec gootgcaceg
<210> SEQ ID NO.: 16
<211>23
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<223> MutC255GF
<400>
ctctggctctc acagtgacac gc
<210> SEQ ID NO.: 17
<211>20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<223> Mut E291XR
<400>
gcaccgagac tcaccgcaat
<210> SEQ ID NO.: 18
<211>20
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<223> Ex7F
<400>
ggcgaaggga tgggtagggg
010 SEO ID NO - 10
<210> SEQ ID NO.: 19
<211>20
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<223> Ex7R
<400>
gttgccatgt caggaagcgc
<210> SEQ ID NO.: 20
<211> 20
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>

<221> cebador

<223> Ex9F
<400>
cccctgacct cgctccccgg
<210> SEQ ID NO.: 21
<211> 20
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<223> Ex9R
<400>
gctgcaggca ggggcgacgc
<210> SEQ ID NO.: 22
<211>20
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<223> Ex10F
<400>
atgecettet etecteetge
<210> SEQ ID NO.: 23
<211> 24
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<223> Ex10R
<400>
agccctcagc gtcgtggata

<210> SEQ ID NO.: 24

<211>20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Mut1432delGF

<400>

gggacatcca ggcccccgcc

<210> SEQ ID NO.: 25

<211>20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex11F

<400>

tectecece cectecagee

<210> SEQ ID NO.: 26

<211> 20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Ex11R

<400>

gctgggacgg ctgtcctgcg

<210> SEQ ID NO.: 27

<211>20

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial		
<220>		
<221> cebador		
<223> Ex13F		
<400>		:
gtcatcttcc ttgctgcctg	·	
<210> SEQ ID NO.: 28		
<211>30		
<212> polinucleótido		
<213> secuencia artificial	•	, •
<220>	•	•••••
<221> cebador	·	::
<223> Ex13R		•
<400>		•
ttccacaagg aggtttcaag gttggggggg	•	:. .
		•
<210> SEQ ID NO.: 29		
<211> 13		
<212> polinucleótido		
<213> secuencia artificial		•
<220>		
<221> cebador		:
<223> MutH635NR		
<400>		
acctcttggc tgggtcaggt tct	·	
<210> SEQ ID NO.: 30	·	
<211> 20		
<212> polinucleótido		
<213> secuencia artificial		
<220>		
<221> cebador		
-221× 0000001		

	•				
<223> Ex14F					•
<400>			•		•
aaatttctgg aatcttctgg					
<210> SEQ ID NO.: 31					
<211> 20					
			•		
<212> polinucleótido <213> secuencia artificial					
<220>					
<221> cebador					••••
<223> Ex14R					• • • •
<400> gcagagagag gctcaggagg	•				•
gcagagagag geceuss-ss					•
<210> SEQ ID NO.: 32		•			••••
<211> 20					:
<212> polinucleótido					::
<213> secuencia artificial					
<220>				•	
<221> cebador					-
<223> Mut2140+1G>AR			•		
<400>					
gaaacaaggc gtgtgccaga					
210. GDO ID NO : 22					•••
<210> SEQ ID NO.: 33					
<211> 22					
<212> polinucleótido					
<213> secuencia artificial					
<220>				•	
<221> cebador					
<223> Ex15F					
<400>					
gaagggeetg cagcaegtgg ca					

£}

<210> SEQ ID NO.: 34
<211> 19
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<223> Ex15R
<400>
tagggagggc ccagtcttt
<210> SEQ ID NO.: 35
<211>20
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<223> Ex17F
<400>
gggtetetgg teteggggge
<210> SEQ ID NO.: 36
<211>22
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<223> Ex17R
<400>
ggctctggct ttctagagag gg
<210> SEQ ID NO.: 37
<211>23

<212> polinucleótido

•	
<213> secuencia artificial	
<220>	
<221> cebador	
<400>	
cgggtcggga cactgcctgg cag	
<210> SEQ ID NO.: 38	
<211> 23	
<212> polinucleótido	
<213> secuencia artificial	
<220>	•
<221> cebador	•••
<400>	_
cgggtcggga ccctgcctgg cag	•
	•
<210> SEQ ID NO.: 39	
<211> 23	•
<212> polinucleótido	
<213> secuencia artificial	
<220>	
<221> cebador	
<400>	
ctgccaggca gtgtcccgac ccg	••
<210> SEQ ID NO.: 40	••
<211>23	
<212> polinucleótido	
<213> secuencia artificial	
<220>	
<221> cebador	
<400>	
ctgccaggca gggtcccgac ccg	

ż

<210> SEQ ID NO.: 41				
<211>23				
<212> polinucleótido				
<213> secuencia artificial	•			
<220>				
<221> cebador			r	
<400>				•
atgcatttcc cgtcttggca ctg				
<210> SEQ ID NO.: 42				:
<211>23				• • • •
<212> polinucleótido				
<213> secuencia artificial				••••
<220>		•		••••
<221> cebador				
<400>				
gatgcatttc cctcttggca ctg	•			
<210> SEQ ID NO.: 43				
<211> 25				
<212> polinucleótido	•			;e **
<213> secuencia artificial				
<220>				
<221> cebador	,			•••
<400>				
gatgcatttc ccgtcttggc actgg				
<210> SEQ ID NO.: 44		•		
<211> 25				
<212> polinucleótido			٠	
<213> secuencia artificial				
<220>				
<221> cebador	•			

<400> agatgcattt ccctcttggc actgg <210> SEQ ID NO.: 45 <211>25 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> tgtctcttct gtagtgtctg tcacc <210> SEQ ID NO.: 46 <211>25 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> gtctcttctg tctgtgtctg tcacc <210> SEQ ID NO.: 47 <211>27 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> ctgtctcttc tgtagtgtct gtcacct <210> SEQ ID NO.: 48 <211>27 <212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>	•			•
<221> cebador			•	
<400>				
tgtctcttct gtctgtgtct gtcacct			• .	
<210> SEQ ID NO.: 49				
<211>23		·	•	
<212> polinucleótido				•
<213> secuencia artificial			,	
<220>				•••••
<221> cebador				
<400>			•	
ggccgtgtca accgctgcat tcc		•		•••••
	•			•••••
<210> SEQ ID NO.: 50				
<211>21				
<212> polinucleótido				
<213> secuencia artificial				
<220>				• • • • • •
<221> cebador	•			****
<400> gccgtgtcaa ccgctgcatt c				
geografica cogocycus			•	
<210> SEQ ID NO.: 51		•		•••
<211> 25				••••
<212> polinucleótido				•
<213> secuencia artificial				
<220>				
<221> cebador				
<400>		•		
aggaatgcag cgtttgacac ggccc				
<210> SEQ ID NO.: 52		•		
<211> 27				
~211~ 21				

<212> polinucleótido	
<213> secuencia artificial	
<220>	
<221> cebador °	
<400>	
gaggaatgca gcgtttgaca cggcccc	
<210> SEQ ID NO.: 53	•
<211>23	
<212> polinucleótido	•
<213> secuencia artificial	
<220>	
<221> cebador	••••
<400>	····
agctgtgggg gccgtgtcaa ccg	
<210> SEQ ID NO.: 54	
<211> 23	••••
<212> polinucleótido	
<213> secuencia artificial	
<220>	
<221> cebador	
<400>	
agetgtgggg gegtgtcaae ege	
010 TD NO . 55	
<210> SEQ ID NO.: 55	
<211> 23	
<212> polinucleótido	
<213> secuencia artificial	
<220>	
<221> cebador	
<400>	
cggttgacac ggccccaca gct	

<210> SEQ ID NO.: 56
<211>23
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebader
<400>
gcggttgaca cgccccaca gct
<210> SEQ ID NO.: 57
<211>21
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
caaggctgtc gtaagtgtgg c
<210> SEQ ID NO.: 58
<211>23
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
gcaaggctgt cgtaagtgtg gcc
<210> SEQ ID NO.: 59
<211>23
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
· ·

<221> cebador

<400> caaggetgte gttaagtgtg gee <210> SEQ ID NO.: 60 <211>21 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> aaggctgtcg ttaagtgtgg c <210> SEQ ID NO.: 61 <211>24 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> ccggtgctca cctgtggtcc cgcc <210> SEQ ID NO.: 62 <211>24 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> ccggtgctca cccgtggtcc cgcc <210> SEQ ID NO.: 63 . <211> 22 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial

. :			
<220>			
<221> cebador			
<400>	,		
cggtgctcac ctgtggtccc gc		• •	
<210> SEQ ID NO.: 64			
<211>22			
<212> polinucleótido			
<213> secuencia artificial			
<220>		•	
<221> cebador			•
<400>			••••
cggtgctcac ccgtggtccc gc			
<210> SEQ ID NO.: 65			:··· :
<211> 25			•••••
<212> polinucleótido			:. ·
<213> secuencia artificial	,		
<220>	1		****
<221> cebador			
<400>		•	••
gacaacgacc ccgactgcga agatg			:
220 TD NO . 66			
<210> SEQ ID NO.: 66		•	
<211> 25			
<212> polinucleótido			
<213> secuencia artificial			
<220>			
<221> cebador			. :
<400> gacaacgacc.cccgactgcg aagat			
yacaacyacc. cccyaccycy			
<210> SEQ ID NO.: 67			
<211> 23			

<212> polinucleótido		
<213> secuencia artificial		,
<220>		
<221> cebador		•
<400>		•
acaacgaccc cgactgcgaa gat		
<210> SEQ ID NO.: 68	•	
<211>23		
<212> polinucleótido		
<213> secuencia artificial		
<220>		
<221> cebador		
<400>		
acaacgaccc ccgactgcga aga		
<210> SEQ ID NO.: 69		
<211>23		
<212> polinucleótido		
<213> secuencia artificial		
<220>		
<221> cebador		
<400>		
gcggccactc atccgagcca tct		
<210> SEQ ID NO.: 70		
<211>23		
<212> polinucleótido		
<213> secuencia artificial		
<220>		
<221> cebador		
<400>		
gcggccactc acccgagcca tct		

		•	
<210> SEQ ID NO.: 71			
<211> 25			
<212> polinucleótido			
<213> secuencia artificial	•		
<220>			
<221> cebador			
<400>			
tgcggccact catccgagcc atctt			
<210> SEQ ID NO.: 72			
<211> 25			::
<212> polinucleótido			••••
<213> secuencia artificial			
<220>		•	•••••
<221> cebador			••••
<400>			•_ •
tgcggccact cacccgagec atett	•		····
<210> SEQ ID NO.: 73			••••
<211> 23	·		•
<212> polinucleótido			•• •
<213> secuencia artificial			, , ,
<220>		,.	
<221> cebador			
<400>			
ccagctggcg ctgtgatggt ggc			
		•	
<210> SEQ ID NO.: 74			
<211>23			
<212> polinucleótido			•
<213> secuencia artificial		•	
<220>			
<221> cebador	•		

<400>	
ccagctggcg ccgtgatggt ggc	
7.5	
<210> SEQ ID NO.: 75	
<211> 25	
<212> polinucleótido	
<213> secuencia artificial	
<220>	•
<221> cebador	
<400>	
tccagctggc gctgtgatgg tggcc	••••
<210> SEQ ID NO.: 76	••••
<211> 25	:
	:
<212> polinucleótido <213> secuencia artificial	•
	: .
<220>	
<221> cebador	
<400> tccagctggc gccgtgatgg tggcc	
tecagetyge googegangs in	•
<210> SEQ ID NO.: 77	, a
<211> 25	
<212> polinucleótido	ή. -
<213> secuencia artificial	•
<220>	
<221> cebador	
<400>	
ctgcaaggac aaatctgacg aggaa	
<210> SEQ ID NO.: 78	
<211>25	
<212> polinucleótido	

<213> secuencia artificial

<pre><221> cebador <400> ctgcaaggac aactgcggta tgggc <210> SEQ ID NO.: 79 <211> 27 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> actgcaagga caaatctgac gaggaaa <210> SEQ ID NO.: 80 <211> 27 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> actgcaagga caaatctgac gaggaaa <210> SEQ ID NO.: 80 <211> 27 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> </pre>
ctgcaaggac aactgcggta tgggc <210> SEQ ID NO.: 79 <211> 27 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> actgcaagga caaatctgac gaggaaa <210> SEQ ID NO.: 80 <211> 27 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial
<pre><210> SEQ ID NO.: 79 <211> 27 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> actgcaagga caaatctgac gaggaaa <210> SEQ ID NO.: 80 <211> 27 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial </pre>
<pre><211> 27 </pre> <pre><212> polinucleótido </pre> <pre><213> secuencia artificial </pre> <pre><220> </pre> <pre><221> cebador </pre> <pre><400> actgcaagga caaatctgac gaggaaa</pre> <pre><210> SEQ ID NO.: 80 </pre> <pre><211> 27 </pre> <pre><212> polinucleótido </pre> <pre><213> secuencia artificial</pre> <pre></pre> <pre></pre>
<pre><211> 27 </pre> <pre><212> polinucleótido </pre> <pre><213> secuencia artificial </pre> <pre><220> </pre> <pre><221> cebador </pre> <pre><400> actgcaagga caaatctgac gaggaaa</pre> <pre><210> SEQ ID NO.: 80 </pre> <pre><211> 27 </pre> <pre><212> polinucleótido </pre> <pre><213> secuencia artificial</pre> <pre></pre> <pre></pre>
<pre><212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> actgcaagga caaatetgac gaggaaa </pre> <pre><210> SEQ ID NO.: 80 <211> 27 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial </pre>
<pre><213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> actgcaagga caaatctgac gaggaaa <210> SEQ ID NO.: 80 <211> 27 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial </pre>
<pre><220> <221> cebador <400> actgcaagga caaatctgac gaggaaa <210> SEQ ID NO.: 80 <211> 27 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial </pre>
<pre><400> actgcaagga caaatctgac gaggaaa <210> SEQ ID NO.: 80 <211> 27 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial </pre>
actgcaagga caaatctgac gaggaaa <210> SEQ ID NO.: 80 <211> 27 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial
<210> SEQ ID NO.: 80 <211> 27 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial
<211> 27 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial
<211> 27 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial
<213> secuencia artificial
<213> secuencia artificial
<220>
• •
<221> cebador
<400>
actgcaagga caactgcggt atgggcg
<210> SEQ ID NO.: 81
<211> 25
<212> polinucleótido ·····
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
caaatctgac gaggaaaact gcggt

<210> SEQ ID NO.: 82					
<211>25					
<212> polinucleótido		•			
<213> secuencia artificial				•	
<220>		•			
<221> cebador			•		
<400>					
caaatctgac gacaaatctg acgag			•		
<210> SEQ ID NO.: 83					
<211> 27					
<212> polinucleótido					
<213> secuencia artificial	•				
<220>					
<221> cebador					
<400>					
acaaatctga cgaggaaaac tgcggta					
<210> SEQ ID NO.: 84		•			
<211>27					
<212> polinucleótido					
<213> secuencia artificial					
<220>					
<221> cebador					
<400>					
acaaatctga cgacaaatct gacgagg .					
<210> SEQ ID NO.: 85					
<211>23					
<212> polinucleótido					
<213> secuencia artificial					
<220>					

<221> cebador

<400>	
gggtccctcg cagagtgtca ctg	
<210> SEQ ID NO.: 86	
<211> 23	
·	
<212> polinucleótido 212> polinucleótido	•
<213> secuencia artificial	
<220>	
<221> cebador	
<400>	: : .
gggtccctcg ccgagtgtca ctg	
<210> SEQ ID NO.: 87	•
<211>25	::
<212> polinucleótido	•
<213> secuencia artificial	•
<220>	
<221> cebador	
<400>	****
tgggtccctc gcagagtgtc actgt	;_,,
·	14 is 4
<210> SEQ ID NO.: 88	* ***
<211> 25	***
<212> polinucleótido	
<213> secuencia artificial	••••
<220>	
<221> cebador	
<400>	
tgggtccctc gccgagtgtc actgt	
<210> SEQ ID NO.: 89	•
·	
<211> 23	
<212> polinucleótido	
<213> secuencia artificial	

```
<220>
<221> cebador
<400>
aacccatcaa agagtgcggt gag
<210> SEQ ID NO.: 90
<211>23
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
 <220>
 <221> cebador
 <400>
 aacccatcaa atagtgcggt gag
 <210> SEQ ID NO.: 91
 <211>25
 <212> polinucleótido
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> cebador
  <400>
  gaacccatca aagagtgcgg tgagt
  <210> SEQ ID NO.: 92
  <211>25
  <212> polinucleótido
  <213> secuencia artificial
  <220>
  <221> cebador
   <400>
   gaacccatca aatagtgcgg tgagt
   <210> SEQ ID NO.: 93
```

<211>20

<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
tcactctcgg gcccctacca
<210> SEQ ID NO.: 94
<211>21
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
tcactctcgg acccctaccc a
<210> SEQ ID NO.: 95
<211>20
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
cactctcggg cccctaccc
<210> SEQ ID NO.: 96
<211> 19
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>

cactctcgga cccctaccc

			•
<210> SEQ ID NO.: 97			
<211> 25		٠	
<212> polinucleótido			
<213> secuencia artificial			
<220>			
<221> cebador			
<400>			
acgagtgcct gtgcgccgac ggctt			
<210> SEQ ID NO.: 98	•		
<211> 25			
<212> polinucleótido			
<213> secuencia artificial		•	
<220>			
<221> cebador			
<400>			
acgagtgcct gtacgccgac ggctt			
<210> SEQ ID NO.: 99			
<211>23			
<212> polinucleótido			
<213> secuencia artificial			
<220>			•
<221> cebador			
<400>	•		
cgagtgcctg tgcgccgacg gct			
<210> SEQ ID NO.: 100		•	
<211>23			
<212> polinucleótido			
<213> secuencia artificial			
<220>			

<221> cebador

```
<400>
cgagtgcctg tacgccgacg gct
<210> SEQ ID NO.: 101
<211>24
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
 <220>
 <221> cebador
 <400>
 gcgaagatgc gaaggtgatt ccgg
 <210> SEQ ID NO.: 102
<211>25
 <212> polinucleótido
  <213> secuencia artificial
  <220>
  <221> cebador
  <400>
  ggcccagcga agatttccgg gtggg
  <210> SEQ ID NO.: 103
   <211>27
   <212> polinucleótido
   <213> secuencia artificial
   <220>
   <221> cebador
   <400>
    agcgaagatg cgaaggtgat ttccggg
    <210> SEQ ID NO.: 104
    <211>27
    <212> polinucleótido
    <213> secuencia artificial
```

<220>
<221> cebador
<400>
tggcccagcg aagatttccg ggtggga
<210> SEQ ID NO.: 105
<211>21
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
tgaagaagag gtaggcgatg g
<210> SEQ ID NO.: 106
<211> 21
<212> polinucleótido <213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400> cggttggtga agacgatgga g
Cddrrddedr gangar an
<210> SEQ ID NO.: 107
<211>23
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
gtgaagaaga ggtaggcgat gga
<210> SEQ ID NO.: 108
<710> SEG ID HOUSE

<211>23

<212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> ccggttggtg aagacgatgg agc <210> SEQ ID NO.: 109 <211>25 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> ctccatcgcc tacctcttct tcacc <210> SEQ ID NO.: 110 <211>25 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> ctccatcgcc taactcttct tcacc <210> SEQ ID NO.: 111 <211>27 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> gctccatcgc ctacctcttc ttcacca

•
<210> SEQ ID NO.: 112
<211> 27
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
gctccatcgc ctaactcttc ttcacca
<210> SEQ ID NO.: 113
<211>25
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
tgccggttgg tgaagaagag gtagg
<210> SEQ ID NO.: 114
<211> 25
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
gtgccggttg gtgagaagag gtagg
<210> SEQ ID NO.: 115
<211>27
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador

<400>		
gtgccggttg gtgaagaaga ggtaggc		
9090095009 9-5- 0 0 1		
<210> SEQ ID NO.: 116	• .	
<211> 27		
<212> polinucleótido		•
<213> secuencia artificial		
<220>		
<221> cebador	•	
<400>		
cgtgccggtt ggtgagaaga ggtaggc		•
010: GDO ID NO : 117		••••
<210> SEQ ID NO.: 117		
<211>25		
<212> polinucleótido		••••
<213> secuencia artificial		• • •
<220>	•	:.
<221> cebador		••
<400>		•••
caatagaatc tactggtctg acctg		•••
<210> SEQ ID NO.: 118		•••
<211> 25		***
<212> polinucleótido		
<213> secuencia artificial		•••
<220>		•••
<221> cebador	•	
<400>		
caatagaatc tagtggtctg acctg		-
110		•
<210> SEQ ID NO.: 119		•
<211> 27		
<212> polinucleótido		
<213> secuencia artificial	•	•

•		
<220>		
<221> cebador		
<400>		
gcaatagaat ctactggtct gacctgt		
<210> SEQ ID NO.: 120		
<211> 27		
<212> polinucleótido		
<213> secuencia artificial		
<220>		
<221> cebador		
<400>		••••
gcaatagaat ctagtggtct gacctgt		••••
<210> SEQ ID NO.: 121		
<211> 25		••••
<212> polinucleótido		•
<213> secuencia artificial		
<220>		••••
<221> cebador		
<400>		
ggcccccgac gggctggctg tggac		400
		••••
<210> SEQ ID NO.: 122		••••
<211> 25	•	٠.
<212> polinucleótido		
<213> secuencia artificial		
<220>	•	
<221> cebador		
<400>		
ggcccccgac ggctggctgt ggact		
<210> SEQ ID NO.: 123		
-		

<211> 25

<212> polinucleótido	
<213> secuencia artificial	
<220>	
<221> cebador	
<400>	
gtccacagec agecegtegg gggee	
<210> SEQ ID NO.: 124	
<211> 25	
<212> polinucleótido	
<213> secuencia artificial	
<220>	•••••
<221> cebador	••••
<400>	
agtccacage cageegtegg gggee	•••••
△10> SEO ID NO • 125	•
<210> SEQ ID NO.: 125 <211> 25	:. ·.
	••••
<212> polinucleótido <213> secuencia artificial	•••••
<220>	
<221> cebador	
<400>	
gegggagtte cecagt ceagt	
·	
<210> SEQ ID NO.: 126	
<211> 25	
<212> polinucleótido	
<213> secuencia artificial	
<220>	
<221> cebador	
<400>	
gcgggagttc cctagtcagt ccagt	

<210> SEQ ID NO.: 127
<211> 23
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
cgggagttcc ccagtcagtc cag
<210> SEQ ID NO.: 128
<211>23
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
cgggagttcc ctagtcagtc cag
<210> SEQ ID NO.: 129
<211> 25
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
ctgtccccag aggatatggt tctct
<210> SEQ ID NO.: 130
<211>25
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador

<400> ctgtccccag agaatatggt tctct <210> SEQ ID NO.: 131 <211>23 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> tgtccccaga ggatatggtt ctc <210> SEQ ID NO.: 132 <211>23 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> tgtccccaga gaatatggtt ctc <210> SEQ ID NO.: 133 <211>23 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> tggttctctt ccacaacctc acc <210> SEQ ID NO.: 134 <211>23 <212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220> <221> cebador <400> tggttctctt caacaacctc acc <210> SEQ ID NO.: 135 <211>25 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> atggttctct tccacaacct caccc <210> SEQ ID NO.: 136 <211>25 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> atggttctct tcaacaacct caccc <210> SEQ ID NO.: 137 <211>25 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> gctgaccttt agcctgacgg tggat <210> SEQ ID NO.: 138

<211>25

	<212> polinucleótido	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<221> cebador	
٠	<400>	
	agctgacctt tagctgacgg tggat	
	<210> SEQ ID NO.: 139	
	<211>27	
	<212> polinucleótido	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<221> cebador	
	<400>	
	agctgacctt tagcctgacg gtggatg	
	<210> SEQ ID NO.: 140	
	<211> 27	
	<212> polinucleótido	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<221> cebador	
	<400>	
1	gagetgaeet ttagetgaeg gtggatg	
	<210> SEQ ID NO.: 141	
	<211>23	
•	212> polinucleótido	
	213> secuencia artificial	
<	~220>	
<	221> cebador	
<	400>	
<u>,</u> t	gctcctcgt cttcctttgc ctg	

<400> gactcacage acgtctcctg ggact <210> SEQ ID NO.: 146 <211>25 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> gactcacage acateteetg ggact <210> SEQ ID NO.: 147 <211>23 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> actcacagca cgtctcctgg gac <210> SEQ ID NO.: 148 <211>23 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> actcacagca catctcctgg gac <210> SEQ ID NO.: 149 <211>23 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ccatcgtggc agcgaaactc gtc

<210> SEQ ID NO.: 150

<211>23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

atgcacttcc cacgtcctgg gag

<210> SEQ ID NO.: 151

<211>21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

catcgtggca gcgaaactcg t

<210> SEQ ID NO.: 152

<211>-21

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgcacttccc acgtcctggg a

••••

210> SEQ ID NO.: 153
<211> 20
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador Ex8F
<400>
cattggggaa gagcctcccc
210× 0EO ID NO - 154
210> SEQ ID NO.: 154
<211>20
212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador Ex8R
<400> gcctgcaagg ggtgaggccg
georgeaagg ggrgaggeog
210> SEQ ID NO.: 155
<211>20
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador Ex12F
<400>
actggcatca gcacgtgacc
210> SEQ ID NO.: 156
<211>20
<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

	<220>	
	<221> cebador Ex12R	
	<400>	:
	cgtgtgtcta tccggccacc	
	210> SEQ ID NO.: 157	
	<211>20	
	<212> polinucleótido	
	<213> secuencia artificial	•
	<220>	
	<221> cebador Ex14F	
	<400>	····
	aaatttctgg aatcttctgg	••••
	210> SEQ ID NO.: 158	····
•	<211>20	· · · · · · ·
	<212> polinucleótido	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	****
	<221> cebador Ex14R	
	<400>	****
	gcagagaga gctcaggagg	****
		4000
	210> SEQ ID NO.: 159	
	<211>20	*****
	<212> polinucleótido	*****
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<221> cebador Ex16F	
	<400>	•
	gcgctttcct gccgtgacca	

210> SEQ ID NO.: 160 <211>23 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador Ex16R <400> cctgtccagg agaaaaagtg aac 210> SEQ ID NO.: 161 <211>23 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador MutI771TF <400> cagtagcgtg agggctctgt caa 210> SEQ ID NO.: 162 <211>19 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220>

<221> cebador Mut2389+4A>GR

ctgggggacc ggccggcgc

210> SEQ ID NO.: 163					
<211>23					
<212> polinucleótido				•	
<213> secuencia artificial			٠.		
<220>		•		•	•
<221> cebador	•				
<400>					
tgtcaagctg ggtgctgagg	cag			•	
210> SEQ ID NO.: 164					
<211>23					•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••
<212> polinucleótido					••••
<213> secuencia artificial				•	
<220>	•		•	•	•••••
<221> cebador					•••••
<400>	•				<u>.</u> .
tgtcaagctg gttgctgagg	cag				
210> SEQ ID NO.: 165		• •			
<211>21		•			•••••
<212> polinucleótido		•			:**:
<213> secuencia artificial					
<220>				•	
<221> cebador					••••
<400>					****
gtcaagctgg gtgctgaggc	a				

210> SEQ ID NO.: 166 <211>21 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> gtcaagctgg ttgctgaggc a 210> SEQ ID NO.: 167 <211>23 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> ggtccctcgc agagtgtcac tgt 210> SEQ ID NO.: 168 <211>23 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> ggtccctcgc actgtgagag cca 210> SEQ ID NO.: 169

<211>21

<212> polinucleótido

```
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
gtccctcgca gagtgtcact g
210> SEQ ID NO.: 170
<211>21
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
 gtccctcgca ctgtgagagc c
210> SEQ ID NO.: 171
<211>21
 <212> polinucleótido
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> cebador
 <400>
 ccgtcggggg cctggatgtc t
 210> SEQ ID NO.: 172
 <211>21
 <212> polinucleótido
 <213> secuencia artificial
 <220>
```

<221> cebador

<400> cccgtcgggg tctggatgtc t 210> SEQ ID NO.: 173 <211>23 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> cccgtcgggg gcctggatgt ctc 210> SEQ ID NO.: 174 <211>23 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> gcccgtcggg gtctggatgt ctc 210> SEQ ID NO.: 175 <211> 25 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220>

<221> cebador

ccggttggtg aagaagaggt aggcg

```
<210> SEQ ID NO.: 176
<211>25
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
cggttggtga agaaagaggt aggcg
<210> SEQ ID NO.: 177
<211>27
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
gccggttggt gaagaagagg taggcga
<210> SEQ ID NO.: 178
 <211>27
<212> polinucleótido
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> cebador
 <400>
 ccggttggtg aagaaagagg taggcga
```

<210> SEQ ID NO.: 179
<211> 23
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
actggaagct ggcgggacca cag
<210> SEQ ID NO.: 180
<211>23
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
gcactggaag ctgggaccac agg
<210> SEQ ID NO.: 181
<211>23
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
ctgtggtccc gccagcttcc agt

```
<210> SEQ ID NO.: 182
<211>23
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
cctgtggtcc cagcttccag tgc
<210> SEQ ID NO.: 183
<211>21
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador .
<400>
gcgggagttc cccagtcagt c
<210> SEQ ID NO.: 184
 <211>21
 <212> polinucleótido
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> cebador
 <400>
 gcgggagttc accagtcagt c
```

<210> SEQ ID NO.: 185 <211>23 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> ggcgggagtt ccccagtcag tcc <210> SEQ ID NO.: 186 <211>23 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> ggcgggagtt caccagtcag tcc <210> SEQ ID NO.: 187 <211>23 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400>

ccccatcggt aagcgcgggc cgg

<210> SEQ ID NO.: 188 <211>23 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> ccccatcggt aggcgcgggc cgg <210> SEQ ID NO.: 189 <211>23 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> ccggcccgcg cttaccgatg ggg <210> SEQ ID NO.: 190 <211>23 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> ccggcccgcg cctaccgatg ggg <210> SEQ ID NO.: 191

<211>23

```
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
gaaaagaggc tggcccaccc ctt
<210> SEQ ID NO.: 192
<211>23
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
gaaaagaggc ttctccttgg ccg
<210> SEQ ID NO.: 193
<211>21
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
 <220>
 <221> cebador
 <400>
 aaaagaggct ggcccacccc t
 <210> SEQ ID NO.: 194
 <211>21
 <212> polinucleótido
 <213> secuencia artificial
```

<212> polinucleótido

<220> <221> cebador <400> aaaagaggct tctccttggc c <210> SEQ ID NO.: 195 <211>25 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> cgccttcccg tgctcaccca cagcc <210> SEQ ID NO.: 196 <211>25 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> cgccttcccg tgttcaccca cagcc <210> SEQ ID NO.: 197 <211>25 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador

ggctgtgggt gagcacggga aggcg

<210> SEQ ID NO.; 198

<211>25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ggctgtgggt gaccacggga aggcg

<210> SEQ ID NO.: 199

<211>25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

actatctcca ccgtggtgag cccag

<210> SEQ ID NO.: 200

<211>25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador .

<400>

actatctcca ccatggtgag cccag

••••

.

<210> SEQ ID NO.: 201 <211>25 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> ctgggctcac cacggtggag atagt <210> SEQ ID NO.: 202 <211>25 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> ctgggctcac catggtggag atagt <210> SEQ ID NO.: 203 <211>25 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> gggctctgtc cattgtcctc cccat

<210> SEQ ID NO.: 204 <211>25 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> gggctctgtc cactgtcctc cccat <210> SEQ ID NO.: 205 <211>25 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> atggggagga caatggacag agccc <210> SEQ ID NO.: 206 <211>25 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400>

atggggagga cagtggacag agccc

<210> SEQ ID NO.: 207 <211> 25 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> tgcaacatgg ctagagactg ccggg <210> SEQ ID NO.: 208 <211>25 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> tgcaacatgg ctggagactg ccggg <210> SEQ ID NO.: 209 <211>23 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador

gcaacatggc tagagactgc cgg

<210> SEQ ID NO.: 210 <211>23 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> gcaacatggc tggagactgc cgg <210> SEQ ID NO.: 211 <211>23 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> tgctgatgac ggtgtcatag gaa <210> SEQ ID NO.: 212 <211>23 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador

tgctgatgac gatgtcatag gaa

```
<210> SEQ ID NO.: 213
<211>21
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
gctgatgacg gtgtcatagg a
<210> SEQ ID NO.: 214
<211>21
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
 <220>
 <221> cebador
 <400>
 gctgatgacg atgtcatagg a
 <210> SEQ ID NO.: 215
 <211>23
 <212> polinucleótido
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> cebador
 <400>
 tccaaacttc actccatctc aag
```

<210> SEQ ID NO.: 216 <211>23 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> tccaaacttc agtccatctc aag <210> SEQ ID NO.: 217 <211>23 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> cttgagatgg agtgaagttt gga <210> SEQ ID NO.: 218 <211>23 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador

cttgagatgg actgaagttt gga

```
<210> SEQ ID NO.: 219
<211>25
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
gccaagtgga ctgcgacaac ggctc
<210> SEQ IĎ NO.: 220
<211>25
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
gccaagtgga ctacgacaac ggctc
<210> SEQ ID NO.: 221
<211>25
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
 <400>
gagccgttgt cgcagtccac ttggc
```

```
<210> SEQ ID NO.: 222
<211>25
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
gagccgttgt cgtagtccac ttggc
<210> SEQ ID NO.: 223
<211>25
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador.
<400>
ctgctggcca gggacatgag gagct
<210> SEQ ID NO.: 224
<211>25
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
ctgctggcca ggtacatgag gagct
<210> SEQ ID NO.: 225
<211>25
```

<212> polinucleótido

```
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
agctcctcat gtccctggcc agcag
<210> SEQ ID NO.: 226
<211>25
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
agctcctcat gtacctggcc agcag
<210> SEQ ID NO.: 227
<211>25
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
ctcgccgcgg cggggactgc aggta
<210> SEQ ID NO.: 228
<211>25
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
```

<221> cebador

ctcgccgcgg cgaggactgc aggta <210> SEQ ID NO.: 229 <211>25 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> tacctgcagt ccccgccgcg gcgag <210> SEQ ID NO.: 230 <211>25 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> tacctgcagt cctcgccgcg gcgag <210> SEQ ID NO.: 231 <211>25 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador

gaccatcttg gaggatgaaa agagg

<400>

<400>

```
<210> SEQ ID NO.: 232
<211>25
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
gaccatcttg gacgatgaaa agagg
<210> SEQ ID NO.: 233
<211>25
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
cctctttca tcctccaaga tggtc
<210> SEQ ID NO.: 234
<211>25
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
cctctttca tcgtccaaga tggtc
```

```
<210> SEQ ID NO.: 235
<211>27
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
gttttcctcg tcagatttgt ccttgca
<210> SEQ ID NO.: 236
<211>27
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220> .
<221> cebador
<400>
gttttcctcg tcacatttgt ccttgca
<210> SEQ ID NO.: 237
<211>25
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
 <220>
 <221> cebador
 <400>
 ttttcctcgt cagatttgtc cttgc
```

<210> SEQ ID NO.: 238 <211>25 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> ttttcctcgt cacatttgtc cttgc <210> SEQ ID NO.: 239 <211>25 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> ttgtccttgc agtcggggcc acta <210> SEQ ID NO.: 240 <211>25 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador

ttgtccttgc agacggggcc accat

<400>

<210> SEQ ID NO.: 241

<211> 23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgtccttgca gtcggggcca cca

<210> SEQ ID NO.: 242

<211>23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tgtccttgca gacggggcca cca

<210> SEQ ID NO.: 243

<211>25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

agcccagtag cgtgagggct ctgtc

```
<210> SEQ ID NO.: 244
<211> 25
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
agcccagtag cgagaggct ctgtc
<210> SEQ ID NO.: 245
<211>25
:<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
 <40.0>
 gacagagece teaegetact ggget
 <210> SEQ ID NO.: 246
 <211>25
 <212> polinucleótido
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> cebador
 <400>
 gacagagece tetegetact ggget
 <210> SEQ ID NO.: 247
```

<211>25

<2	12> polinucleótido	•	
<2	13> secuencia artificial		
<2:	20>		
<2	221> cebador		
<4	100>		
to	egeettget eetegeegeg geggg		
	210> SEQ ID NO.: 248		
	211> 25		:
	212> polinucleótido		••••
	213> secuencia artificial		
<2	220>		••••
<2	221> cebador		••••
	400>		•
to	cgccttgct ccccgccgcg gcggg		
			``
_	010× GDO TD NO - 040		·:·
	210> SEQ ID NO.: 249		" , ", "
	211> 25		
	212> polinucleótido		
	213> secuencia artificial	•	19
	220>		•••
	221> cebador		•••
	400>	•	
C	ccgccgcgg cgaggagcaa ggcga		
<	210> SEQ ID NO.: 250		
	211> 25		
	212> polinucleótido		
	213> secuencia artificial		
	~13~ 2codottota at attioum		

<220> <221> cebador <400> cccgccgcgg cggggagcaa ggcga <210> SEQ ID NO.: 251 <211>25 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> acggctacag ctacccctcg gtgag <210> SEQ ID NO.: 252 <211>25 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador <400> cggctacagc tacccctcg gtgag <210> SEQ ID NO.: 253 <211>25 <212> polinucleótido <213> secuencia artificial <220> <221> cebador ...

<400>

ctcaccgagg ggtagctgta gccgt

<210> SEQ ID NO.: 254

<211>25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ctcaccgagg gggtagctgt agccg

<210> SEQ ID NO.: 255

<211>25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cccaggagac gtgctgtgag tcccc

<210> SEQ ID NO.: 256

<211>25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador .

<400>

cccaggagac gtactgtgag tcccc

```
<210> SEQ ID NO.: 257
 <211> 25
 <212> polinucleótido
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> cebador
<400>
 ggggactcac agcacgtctc ctggg
 <210> SEQ ID NO.: 258
 <211>25
 <212> polinucleótido
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> cebador
 <400>
 ggggactcac agtacgtctc ctggg
 <210> SEQ ID NO.: 259
 <211>25
 <212> polinucleótido
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <221> cebador
 <400>
 ctcccatcg gtaagcgcgg gccgg
 <210> SEQ ID NO.: 260
 <211>25
```

<212> polinucleótido

```
<213> secuencia artificial
<220>
<221> cebador
<400>
ctcccatcg gtcagcgcgg gccgg
<210> SEQ ID NO.: 261
<211>25
<212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
 <220>
 <221> cebador
 <400>
 ccggcccgcg cttaccgatg gggag
 <210> SEQ ID NO.: 262
 <211>25
 <212> polinucleótido
<213> secuencia artificial
 <220>
 <221> cebador
 <400>
  ccggcccgcg ctgaccgatg gggag
  <210> SEQ ID NO.: 263
  <211>25
  <212> polinucleótido
  <213> secuencia artificial
  <220>
```

```
<221> cebador
<400>
ccagtacatg aagctggtgg gaga
```

<210> SEQ ID NO.: 264

<211>25

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

tcttgatctt ggcctgggga cagag

<210> SEQ ID NO.: 265

<211>23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cagtacatga agctggtggg agg

<210> SEQ ID NO.: 266

<211>23

<212> polinucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cttgatcttg gcctggggac aga